

CLARA RATZENBÖCK

---

Lokalisation und Expression des Östrogenrezeptors alpha  
und

Zusammenhang zwischen der mitotischen Aktivität  
der Spermatogonien und dem peripheren Östrogenwert  
im menschlichen Hoden mit normaler und  
gestörter Spermatogenese



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

**Lokalisation und Expression des Östrogenrezeptors alpha  
und  
Zusammenhang zwischen der mitotischen Aktivität der  
Spermatogonien und dem peripheren Östrogenwert im  
menschlichen Hoden mit normaler und gestörter  
Spermatogenese**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
am Fachbereich der Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität

eingereicht von

**Clara Ratzenböck**

Tierärztin aus Hofheim/Ts.

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Bergmann  
Prof. Dr. Christine Wrenzycki

Tag der Disputation: 02.06.2014

**Meinen Eltern**



„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Clara Ratzenböck





**Inhaltsverzeichnis**

<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>14</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>15</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>18</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>20</b>
<b>1 Einleitung und Ziele .....</b>	<b>21</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Funktion, Lage und Aufbau des menschlichen Hodens.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Histologie des menschlichen Hodens .....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Keimzellen .....	24
2.2.2 Sertoli-Zellen .....	25
2.2.3 Leydig-Zellen.....	26
2.2.4 Peritubuläre Myoidzellen.....	27
<b>2.3 Ablauf der normalen Spermatogenese .....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Kinetik der humanen Spermatogenese.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5 Störungen der humanen Spermatogenese.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Östrogene.....</b>	<b>33</b>
2.6.1 Biosynthese .....	34
2.6.2 Wirkungsweise .....	35
2.6.3 Östrogenwerte im Blut .....	36
2.6.4 Einfluss von Östrogenen auf Spermatogenese und Fertilität .....	36
<b>2.7 Östrogenrezeptoren (ERs) .....</b>	<b>37</b>
<b>2.8 Zelluläre Lokalisation und Expression des ER<math>\alpha</math> im Hoden .....</b>	<b>39</b>
<b>2.9 Zellzyklus und Proliferationsmarker Ki-67 .....</b>	<b>42</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Probenumfang.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2 Probengewinnung .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinschnitte) .....</b>	<b>46</b>
3.2.1.1 Fixation in Bouin'scher Lösung.....	46

3.2.1.2 Entwässerung der Proben .....	46
3.2.1.3 Einbettung der Proben .....	47
3.2.1.4 Beschichtung der Objektträger (OT).....	47
3.2.1.5 Herstellung der Paraffinschnitte .....	47
3.2.1.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) .....	48
3.2.2 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Gefrierschnitte).....	49
3.2.2.1 Vorbereitungen .....	49
3.2.2.2 Herstellung der Gefrierschnitte.....	49
3.2.2.3 Fixation der Gefrierschnitte .....	50
3.3 Nachweis der ER $\alpha$ -Expression mittels RT-PCR nach UV-LAM.....	50
3.3.1 UV-LAM.....	50
3.3.2 RNA-Extraktion aus mikrodisektiertem Gewebe mit dem RNeasy Micro Kit (Cat.No. 74004) .....	51
3.3.3 RT-PCR .....	52
3.3.3.1 DNase-Verdau .....	52
3.3.3.2 Reverse Transkription (RT) .....	53
3.3.3.3 PCR .....	54
3.3.3.4 Agarosegel-Elektrophorese .....	55
3.4 Nachweis der zellulären Lokalisation des ER $\alpha$ auf mRNA-Ebene mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) .....	56
3.4.1 Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA-Sonden .....	56
3.4.1.1 Extraktion und Isolation von RNA aus Gefriermaterial ....	56
3.4.1.1.1 Vorbereitungen .....	56
3.4.1.1.2 RNA-Extraktion mit TRIzol® Reagent .....	57
3.4.1.1.3 Isolation der RNA .....	57
3.4.1.1.4 RT-PCR .....	58
3.4.1.1.5 Aufreinigung des PCR-Fragmentes .....	58
3.4.1.1.6 Klonierung .....	59
3.4.1.1.7 Plasmid-Extraktion mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit .....	61
3.4.1.1.8 Herausschneiden des ER $\alpha$ -Inserts aus dem Plasmid mit Hilfe von Not-I (antisense) und Nco-I (sense).....	62
3.4.2 ISH ER $\alpha$ .....	63

<b>3.5 Nachweis der zellulären Lokalisation des ER<math>\alpha</math> mittels</b>	
Immunhistochemie (IHC) .....	66
<b>3.6 Verifizierung der zytoplasmatischen ER<math>\alpha</math>-Lokalisation mittels RT-PCR.....</b>	<b>68</b>
3.6.1 RNA-Extraktion aus Paraffingewebe mit dem RNeasy	
FFPE Kit (Cat.No. 74404) .....	69
3.6.2 RNA-Messung .....	70
3.6.3 RT-PCR .....	70
<b>3.7 Charakterisierung immunopositiver interstitieller Zellen nach</b>	
ER $\alpha$ -IHC (HC-20) und UV-LAM mittels RT-Nested-PCR.....	71
3.7.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinschnitte)	
für die IHC .....	71
3.7.2 IHC ER $\alpha$ .....	71
3.7.3 UV-LAM.....	71
3.7.4 RNA-Extraktion aus mikrodisektiertem Gewebe mit dem	
RNeasy Plus Mini Kit (Cat.No. 74134) .....	72
3.7.5 Reverse Transkription .....	72
3.7.6 Nested-PCR .....	73
<b>3.8 Nachweis der ER<math>\alpha</math>-Expression auf Proteinebene mittels</b>	
Immunoblot Analyse (IB) .....	74
3.8.1 Extraktion und Isolation der Proteine.....	74
3.8.2 IB ER $\alpha$ .....	75
3.8.2.1 Probenvorbereitung.....	75
3.8.2.2 Gelelektrophorese und Elektroblothing .....	75
3.8.2.3 Immunbestimmung.....	76
<b>3.9 Nachweis der ER<math>\alpha</math>-, ER<math>\beta</math>- und GPER-Expression mittels</b>	
quantitativer RT-PCR (RT-qPCR).....	77
3.9.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinschnitte)	
für die Extraktion von RNA aus Paraffinmaterial .....	77
3.9.2 RNA-Extraktion aus Paraffingewebe mit dem RNeasy	
FFPE Kit (Cat.No. 74404) .....	77
3.9.3 Einstellung der RNA .....	77
3.9.4 RT-PCR .....	78
3.9.5 qPCR.....	79
3.9.5.1 cDNA-Verdünnungsreihe.....	79

3.9.5.2 Genexpressionsvergleich unterschiedlicher Hodenbiopsien .....	82
3.9.5.3 Statistische Verfahren .....	83
3.10 Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 mittels IHC.....	83
3.11 Bestimmung des peripheren Östrogenwertes .....	85
3.12 Histomorphometrische Analyse an Ki-67-gefärbten Paraffinschnitten und Korrelation mit dem peripheren Östrogenwert.....	85
4 Ergebnisse .....	87
4.1 RT-PCR ER $\alpha$ nach UV-LAM.....	87
4.1.1 Normale Spermatogenese.....	87
4.1.2 Sertoli cell only-Syndrom.....	87
4.2 ISH ER $\alpha$ .....	89
4.3 IHC ER $\alpha$ .....	90
4.3.1 HC-20-Antikörper .....	90
4.3.2 F-10-Antikörper .....	90
4.3.3 H-184-, 1F3-, 1D5- und 60C-Antikörper .....	93
4.4 RT-PCR von Paraffinschnitten mit nsp und TIN .....	94
4.5 RT-Nested-PCR .....	95
4.5.1 ER $\alpha$ .....	95
4.5.2 StAR.....	95
4.6 IB ER $\alpha$ .....	97
4.6.1 HC-20-Antikörper .....	97
4.6.2 F-10-Antikörper.....	98
4.6.3 H-184-, 1F3-, 1D5- und 60C-Antikörper .....	99
4.7 RT-qPCR ER $\alpha$ .....	100
4.8 RT-qPCR ER $\alpha$ , ER $\beta$ und GPER im Vergleich.....	102
4.9 IHC Ki-67 .....	104
4.10 Histomorphometrische Analyse an Ki-67-gefärbten Paraffinschnitten und Zusammenhang zwischen mitotischer Aktivität und peripherem Östrogenwert.....	105

<b>5 Diskussion .....</b>	<b>108</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>117</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>119</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>9 Anhang .....</b>	<b>134</b>
<b>9.1 Puffer, Nährböden und Lösungen .....</b>	<b>134</b>
<b>9.2 Bezugsquellen.....</b>	<b>142</b>
<b>9.2.1 Reagenzien.....</b>	<b>142</b>
<b>9.2.2 Geräte.....</b>	<b>147</b>
<b>9.2.3 Sonstige Materialien .....</b>	<b>148</b>
<b>9.2.4 Software .....</b>	<b>149</b>
<b>10 Danksagung.....</b>	<b>150</b>

## Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Fietz D, Ratzenböck C, Hartmann K, Raabe O, Kliesch S, Weidner W, Klug J, Bergmann M (2014) Expression pattern of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. *Histochem Cell Biol*.

### Abstracts/Poster

Beck C, Raabe O, Kliesch S, Bergmann M Estrogens, expression of estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and mitotic activity of spermatogonia in testes of fertile and infertile men. International Workshop 1st Symposium of the Clinical Research Unit KFO 181, Molecular Andrology, Gießen, Mai 2009.

Beck C, Raabe O, Kliesch S, Bergmann M Estrogens, expression of estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and mitotic activity of spermatogonia in testes of fertile and infertile men. Sommerversammlung der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin, Gießen, Juni 2009.

Beck C, Siebert S, Raabe O, Kliesch S, Bergmann M Östrogene, Östrogenrezeptorexpression und Mitoseaktivität der Spermatogonien bei normaler und gestörter Spermatogenese beim Mann. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 2009 (5) 223. 3. DVR-Kongress, Freiburg, November 2009.

Beck C, Siebert S, Raabe O, Kliesch S, Bergmann M Estrogens, expression of estrogen receptor  $\alpha$  and mitotic activity of spermatogonia in testes of fertile and infertile men. *Reproduction in Domestic Animals* 2010 (45) 5. 43. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, München, Februar 2010.

Bergmann M, Beck C, Siebert S, Raabe O, Kliesch S. ER $\alpha$ -Expression und Mitoseaktivität der Spermatogonien bei normaler und gestörter Spermatogenese beim Mann. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 2010 (5) 448. 22. DGA-Jahrestagung, Hamburg, Oktober 2010.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
Ad	Adark (Spermatogonien)
Ap	Apale (Spermatogonien)
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
APES	3-Aminopropyltriethoxy-Silane
BHS	Blut-Hoden-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
c-DNA	copy-DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
Ct	threshold cycle
Da	Dalton
DBD	DNA-bindende Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNS (DNA)	Desoxyribonucleinsäure („-acid“)
Dnase	Desoxyribonuclease
dNTP	desoxy-Ribonucleotidtriphosphat
ER	Östrogenrezeptor („Estrogen Receptor“)
ERR	Estrogen-related Receptor
fsc	fokales sco
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GPED	G-Protein-gekoppelter ER
HCl	Salzsäure
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HRE	hormone response element
hyp	Hypospermatogenese

IB	<b>I</b> mmunoblot
IF	<b>I</b> mmunofluoreszenz
IHC	<b>I</b> mmun <b>h</b> istochemie
IPTG	<b>I</b> sopropylthiogalactosid
ISH	<i><b>I</b>n-situ</i> - <b>H</b> ybridisierung
kDa	<b>K</b> ilodalton
LBD	<b>L</b> iganden- <b>b</b> indende <b>D</b> omäne
LH	<b>l</b> uteinisierendes <b>H</b> ormon
LZ	<b>L</b> eydig-Zelle
MgCl <sub>2</sub>	<b>M</b> agnesiumchlorid
mRNA	Boten („ <b>m</b> essenger“)- <b>R</b> NA
MG (MW)	<b>M</b> olekulargewicht („ <b>m</b> olecular <b>w</b> eight“)
NBT/BCIP	<b>N</b> itro- <b>B</b> lau- <b>T</b> etrazolium/ <b>B</b> romo- <b>C</b> hloro- <b>I</b> ndolyl- <b>P</b> hosphat
N-Terminus	Aminoterminus eines Peptids
NaCl	<b>N</b> atriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCBI	<b>N</b> ational <b>C</b> enter for <b>B</b> iotechnology <b>I</b> nformation
nsp	<b>n</b> ormale <b>S</b> permatogenese
NTB	<b>N</b> itroblautetrazolimchlorid
NTC	<b>N</b> o <b>T</b> emplate <b>C</b> ontrol
OD	<b>o</b> ptische <b>D</b> ichte
OT	<b>O</b> bjektträger
PAK	<b>P</b> rimärantikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („ <b>p</b> hosphate- <b>b</b> uffered- <b>s</b> aline“)
PCNA	<b>P</b> roliferating <b>C</b> ell <b>N</b> uclear <b>A</b> ntigen
PK	<b>P</b> ositivkontrolle
RNA (RNS)	<b>R</b> ibonucleinsäure („ <b>-</b> acid“)
rpm	<b>r</b> evolutions <b>p</b> er <b>m</b> inute
RT-PCR	<b>R</b> everse <b>T</b> ranskription <b>P</b> olymerase <b>K</b> ettenreaktion
RT-qPCR	<b>q</b> uantitative <b>R</b> everse <b>T</b> ranskriptase <b>P</b> olymerase <b>K</b> etten (“ <b>C</b> hain”) <b>r</b> eaktion
SAK	<b>S</b> ekundärantikörper



## Abkürzungsverzeichnis

---

sco	<b>S</b> ertoli-Cell- <b>O</b> nly Syndrom
SDS	<b>S</b> odium <b>d</b> odecylsulfat
sda	<b>S</b> permatid <b>e</b> n <b>a</b> rrest
sga	<b>S</b> permatogonien <b>a</b> rrest
SHBG	<b>S</b> ex <b>h</b> ormon- <b>b</b> indendes <b>G</b> lobulin
SSC	<b>S</b> tandard <b>S</b> aline <b>C</b> itrate
StAR	<b>S</b> teroidogenic <b>A</b> cute <b>R</b> egulatory Protein
SZ	<b>S</b> ertoli- <b>Z</b> elle
sza	<b>S</b> permatozyten <b>a</b> rrest
T	<b>T</b> hymine
TAE	<b>T</b> ris- <b>A</b> cetate- <b>E</b> DTA-Puffer
TIN	<b>t</b> estikuläre <b>i</b> ntraepitheliale <b>N</b> eoplasie
TNMT	<b>T</b> ris- <b>N</b> atriumchlorid- <b>M</b> agnesiumchlorid- <b>T</b> riton-Base
Tris	<b>T</b> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	<b>T</b> ubulusschatten
U	Enzymeinheiten („ <b>u</b> nits“)
UV-LACP	<b>u</b> ltraviolet <b>l</b> aser <b>a</b> ssisted <b>c</b> ell <b>p</b> icking
UV-LAM	<b>U</b> ltraviolet-Laser- <b>a</b> ssistierte <b>M</b> ikrodissektion
WHO	<b>W</b> orld <b>H</b> ealth <b>O</b> rganisation

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1      Ausschnitt eines Hodenkanälchens (Mensch) (nach Holstein, 2008).
- Abb. 2      Normale Spermatogenese (Mensch) (Paraffin, HE, Primärvergrößerung x40).
- Abb. 3      Kinetik der humanen Spermatogenese (aus Bergmann und Kliesch, 2010).
- Abb. 4      Störungen der humanen Spermatogenese (Paraffin, HE, Primärvergrößerung x40).
- Abb. 5      Vergleich der Proteinstrukturen des humanen ER $\alpha$  und ER $\beta$  (modifiziert nach Marino et al., 2006).
- Abb. 6      Nachweis der ER $\alpha$ -mRNA an mikrodisektiertem humanem Hodengewebe mittels RT-PCR.
- Abb. 7      Nachweis der zellulären Lokalisation der ER $\alpha$ -mRNA mittels ISH an Paraffinschnitten mit nsp (Mensch) (Primärvergrößerung x40).
- Abb. 8      Immunhistochemischer Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins mittels HC-20- (A) und F-10-Antikörper (B) an Paraffinschnitten mit nsp (Mensch) (A und B Primärvergrößerung x40, Einschübe in Abb. A und B Primärvergrößerung x20).
- Abb. 9      Immunhistochemischer Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins mittels HC-20- (B) und F-10-Antikörper (C) an Paraffinschnitten mit TIN (Mensch) (Primärvergrößerung x 40).
- Abb. 10      Immunhistochemischer Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins mittels H-184- (A), 1F3- (B), 1D5- (C) und 60C-Antikörper (D) an Paraffinschnitten mit nsp (Mensch) (A - D Primärvergrößerung x 40; Einschübe in A - D Primärvergrößerung x 20).
- Abb. 11      Nachweis der ER $\alpha$ -mRNA an humanem Hodenhomogenat von einem Patienten mit nsp bzw. TIN.
- Abb. 12      Nachweis der ER $\alpha$ - und StAR-m-RNA an immunhistochemisch gefärbten und anschließend mikrodisektierten interstitiellen Zellen im humanen Hoden mittels RT-Nested-PCR.
- Abb. 13      Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins an humanem Hodenhomogenat mit nsp sowie an MCF-7- und T47D-Zellen mittels HC-20-Antikörper.
- Abb. 14      Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins an humanem Hodenhomogenat mit nsp sowie an MCF-7- und T47D-Zellen mittels F-10-Antikörper.

- Abb. 15      Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins an humanem Hodenhomogenat mit nsp sowie an MCF-7- und T47D-Zellen mittels H-184- (A), 1F3- (B), 1D5- (C) und 60C-Antikörper (D).
- Abb. 16      Relative Genexpression von ER $\alpha$  bei unterschiedlichen histologischen Diagnosen im humanen Hoden.
- Abb. 17      Relative Genexpression von ER $\alpha$ , ER $\beta$  und GPER bei unterschiedlichen histologischen Diagnosen im humanen Hoden.
- Abb. 18      Immunhistochemischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 an einem Paraffinschnitt mit nsp (Mensch) (Primärvergrößerung x 40).
- Abb. 19      Zusammenhang zwischen dem arithmetischen Mittelwert immunopositiver Spermatogonien einzelner Patienten und dem entsprechenden peripheren Östrogenwert.

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1	ER $\alpha$ -Lokalisation und -Expression im humanen Hoden.
Tab. 2	Probenumfang und Methodik.
Tab. 3	Primersequenzen RT-PCR ER $\alpha$ .
Tab. 4	Primärantikörper IHC ER $\alpha$ .
Tab. 5	Sekundärantikörper IHC ER $\alpha$ .
Tab. 6	Primersequenzen RT-Nested-PCR ER $\alpha$ und StAR.
Tab. 7	Primersequenzen RT-qPCR $\beta$ -Aktin, GAPDH, ER $\alpha$ , ER $\beta$ und GPER.
Tab. 8	Platten-Belegungsschema cDNA-Verdünnungsreihe RT-qPCR.
Tab. 9	Platten-Belegungsschema Genexpressionsvergleich RT-qPCR.
Tab. 10	Primär- und Sekundärantikörper sowie Detektionssystem IHC Ki-67.
Tab. 11	Expressionswerte für ER $\alpha$ bei Patienten mit nsp, sda, sza, sga und sco.
Tab. 12	Expressionswerte für ER $\alpha$ , ER $\beta$ und GPER bei Patienten mit nsp, sza, sga und sco.
Tab. 13	Prozentsätze Ki-67-immunopositiver Spermatogonien in Keimtubuli mit nsp, hyp, sda, sza und sga.
Tab. 14	Prozentsätze Ki-67-immunopositiver Spermatogonien in Paraffinschnitten mit nsp, hyp, sda, sza und sga sowie entsprechendem peripherem Östrogenwert.

## 1 Einleitung und Ziele

Der menschliche Hoden erfüllt sowohl germinative als auch endokrine Aufgaben. Neben dem in den Leydigzellen synthetisierten Testosteron werden in Sertoli-, Leydig- und Keimzellen Östrogene synthetisiert (Carreau et al., 2008). Diese rücken in der Literatur zunehmend in den Fokus, eine wichtige Rolle für die männliche Fertilität zu spielen. Viele Studien haben gezeigt, dass die Fertilität bei männlichen ER $\alpha$ - (Lubahn et al., 1993; Eddy et al., 1996; Dupont et al., 2000; Chen et al., 2009) oder Aromatase-Knockout-Mäusen (Honda et al., 1998; Robertson et al., 1999; Toda et al., 2001) vermindert ist. Fallberichte über Männer mit ER $\alpha$ - (Smith et al., 1994) oder Aromatase-Defizienz (Übersicht bei Rochira und Carani, 2009) sind dagegen sehr selten. Hierbei zeigten sich eine verminderte Spermienlebensfähigkeit, unbewegliche Spermien, herabgesetzte Spermienanzahl oder spermatogenetische Defekte wie Spermatozytenarrest.

Daneben gibt es in der Literatur zunehmend Hinweise, dass die mitotische Aktivität der Spermatogonien durch Östrogene getriggert wird. In menschlichen Keimtubuli in vitro wird die Apoptose der Spermatogonien durch Östrogene gehemmt (Pentikäinen et al., 2000) und bei Fröschen (D'Istria et al., 2003) und kryptorchiden Mäusen (Li et al., 2007) wird die Proliferation der Spermatogonien durch Östrogene stimuliert. Diese Ergebnisse zeigten sich auch beim Schwein. Nach GnRH-Immunisierung, die eine Involution der Spermatogenese zur Folge hatte, führte eine Östrogeninfusion zu einer erhöhten mitotischen Aktivität in den Hodentubuli (Wagner et al., 2006).

Östrogene entfalten ihre Wirkungen über Östrogenrezeptoren (ERs), von denen zwei Subtypen bekannt sind, ER $\alpha$  (Walter et al., 1985) und ER $\beta$  (Mosselman et al., 1996). Das Vorkommen der ERs im humanen Hoden ist mittlerweile unumstritten, allerdings liegen kontroverse Ergebnisse über ihre präzise zelluläre Lokalisation und Expression, insbesondere über die des ER $\alpha$ , vor. Die Ergebnisse einzelner Studien reichen von einem Fehlen des ER $\alpha$  im menschlichen Hoden (Saunders et al., 2001; Mäkinen et al., 2001) über die Lokalisation in unterschiedlichsten Zellen und dort auch in unterschiedlichen Kompartimenten (Pelletier und El-Alfy, 2000; Pentikäinen et al., 2000; Taylor und Al-Azzawi, 2000; Han et al., 2009; Filipiak et al., 2012) bis hin zu einem Nachweis in fast allen Zellen des Hodens (Cavaco et al., 2009) (Übersicht in Tab. 1). Neben dem Nachweis des Rezeptors im Hoden konnte seine Expression in immaturren Keimzellen sowie Spermatozoen aus Samenproben gesunder Männer nachgewiesen werden (Durkee et al., 1998; Aquila et al., 2004; Lambard et al., 2004; Solakidi et al., 2005; Lambard und Carreau, 2005).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse über die Lokalisation des ER $\alpha$  und die Bedeutung der Östrogene für die mitotische Aktivität und Fertilität sind die Ziele dieser Arbeit wie folgt:

- 1) Nachweis der genauen Lokalisation des ER $\alpha$  im menschlichen Hoden auf mRNA- und Protein-Ebene.

Der Nachweis auf mRNA-Ebene erfolgte mittels ISH. Die Untersuchungen auf Proteinebene wurden mittels Immunhistochemie (IHC) und Immunoblot (IB) unter Verwendung von sechs spezifischen Antikörpern durchgeführt. Es wurden Paraffinschnitte (ISH, IHC) bzw. Gesamthomogenat (IB) von Patienten mit normaler Spermatogenese (nsp) verwendet.

- 2) Untersuchung der Expression des ER $\alpha$  im menschlichen Hoden mit nsp oder Sertoli-Cell-Only Syndrom (sco).

Die Untersuchungen der ER $\alpha$ -Expression erfolgten mittels Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) nach UV-Laser-assistierter Mikrodissektion (UV-LAM) von Keimtubuli bzw. interstitiellem Gewebe von Patienten mit nsp oder sco.

- 3) Untersuchung der quantitativen Expression des ER $\alpha$ , des ER $\beta$  sowie des membran-assoziierten GPER in Abhängigkeit von unterschiedlichen histologischen Diagnosen.

Die Untersuchung erfolgte an Gesamthomogenat von Patienten mit nsp oder Spermatogenesedefekten mittels quantitativer RT-PCR.

- 4) Untersuchung des Proliferationsmusters von Spermatogonien in Abhängigkeit von der jeweiligen histologischen Diagnose und dem peripheren Östrogenwert.

Der Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 erfolgte mittels IHC an Paraffinschnitten mit unterschiedlichen histologischen Diagnosen. Anschließend erfolgten eine Auszählung der gefärbten Schnitte und eine statistische Auswertung.

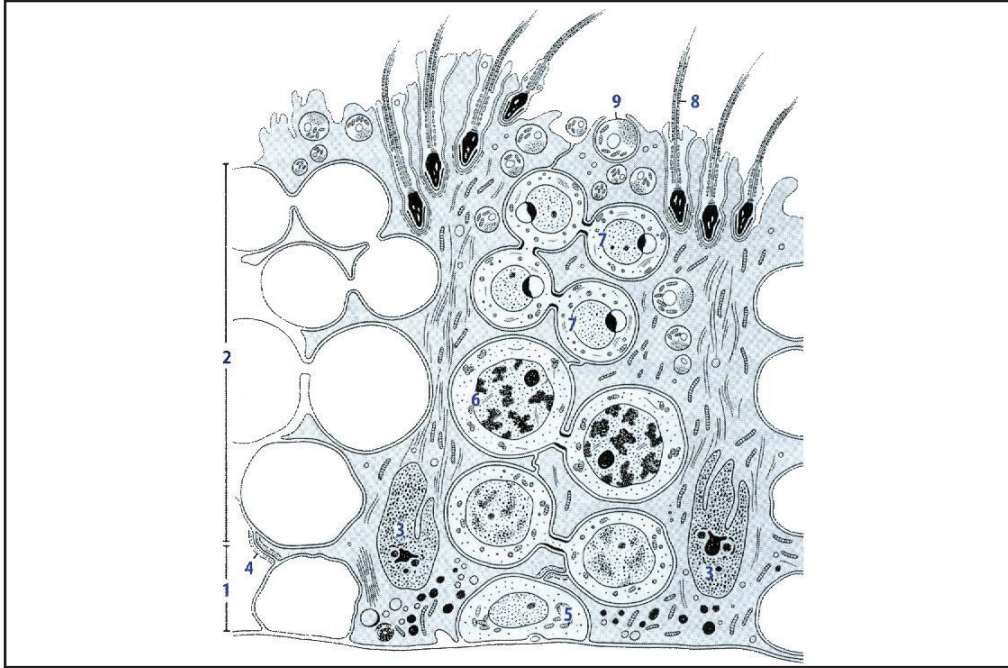
## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Funktion, Lage und Aufbau des menschlichen Hodens**

Der paarig angelegte Hoden ist für die Bildung der männlichen Keimzellen und der Sexualhormone verantwortlich. Er liegt zusammen mit den Nebenhoden von mehreren Hüllen umgeben im Skrotum. Eine derbe Bindegewebsschicht, die Tunica albuginea liegt ihm direkt auf. Von dieser gehen zarte bindegewebige Septen aus, durch die das Hodengewebe in Hodenläppchen, die Lobuli testis unterteilt wird. Jedes Hodenläppchen besteht aus einem oder mehreren stark gewundenen Samenkanälchen, den Tubuli seminiferi contorti. Diese münden direkt oder in Form von Tubuli seminiferi recti in das Hodennetz (Rete testis). Von dort gelangen die Keimzellen über die Ductuli efferentes in den Nebenhoden, wo schließlich Reifung und Transport stattfinden (Übersicht bei Holstein, 2008).

### **2.2 Histologie des menschlichen Hodens**

Die Tubuli seminiferi im geschlechtsreifen Hoden haben einen Durchmesser von ca. 150-250  $\mu\text{m}$  und eine Länge von ca. 30-70 cm. Sie setzen sich aus dem innen gelegenen Keimepithel und einer äußeren myofibrösen Hülle, der Lamina propria zusammen. Die Lamina propria besteht aus einer Basalmembran, einer Kollagenfaserschicht und peritubulären Myoidzellen. Das Keimepithel erreicht eine Höhe von 60-80  $\mu\text{m}$  und setzt sich aus unterschiedlichen Keimzellgenerationen sowie Stützzellen, sog. Sertoli-Zellen (SZ), zusammen (Abb. 1). Das zwischen den Tubuli seminiferi gelegene Interstitium besteht aus hormonbildenden Leydig-Zellen (LZ), Blut- und Lymphgefäßen, Nerven, Makrophagen und Fibroblasten (Übersicht bei Holstein, 2008).



**Abb. 1:** Ausschnitt eines Hodenkanälchens (Mensch) (nach Holstein, 2008).

1 = basales Kompartiment, 2 = adluminales Kompartiment, 3 = Sertoli-Zellkern, 4 = Zell-zu-Zell-Verbindung zwischen zwei Sertoli-Zellen, 5 = Typ A-Spermatogonie (pale), 6 = primäre pachytäne Spermatozyte, 7 = runde Spermatide, 8 = elongierte Spermatide, 9 = Residualkörper.

### 2.2.1 Keimzellen

Im Keimepithel findet die Vermehrung, Reifeteilung und Differenzierung der Keimzellen zu Samenzellen statt. Sie liegen zwischen den Sertoli-Zellen und weisen unterschiedliche Entwicklungsstufen auf. Basal befinden sich die Spermatogonien, lumenwärts folgen die Spermatozyten erster und zweiter Ordnung und lumennah liegen die Spermatiden. Die Spermatogonien lassen sich in Typ A- und Typ B-Spermatogonien einteilen. Typ A kann anhand seiner Kernmorphologie in einen Typ A<sub>pale</sub> (Ap) und A<sub>dark</sub> (Ad) unterteilt werden (Clermont, 1963). Ad-Spermatogonien teilen sich nur selten und werden als testikuläre Stammzellen angesehen. Sie sind gekennzeichnet durch einen dunkel gefärbten Kern von ovoider Gestalt. Ap-Spermatogonien hingegen sind teilungsfähig und differenzieren sich zu Typ B-Spermatogonien. Sie sind gekennzeichnet durch hell granuliertes Chromatin und ein oder zwei Nucleoli (Übersicht bei Weinbauer et al., 2010). Typ B-Spermatogonien treten in die Meiose ein und sind durch das Vorkommen mehrerer Kernkörperchen (Nucleoli)



gekennzeichnet. Die Spermatozyten erster Ordnung sind während der ersten Teilung der Meiose die größten unter den Keimzellen. Die Spermatozyten zweiter Ordnung sind deutlich kleiner und die Kerne beinhalten locker verteiltes Chromatin. Die Spermatiden sind schließlich die kleinsten Zellen des Keimepithels. Frühe Spermatiden weisen eine abgerundete Form und einen runden Zellkern auf. Reife Spermatiden sind langgezogene Zellen mit einem konischen Kern (Übersicht bei Holstein, 2008).

### **2.2.2 Sertoli-Zellen**

Die Sertoli-Zellen stellen die somatischen Zellen des Keimepithels dar. Die charakteristisch verzweigten Zellen wurden im Jahr 1865 von Enrico Sertoli erstmals beschrieben und nach ihm benannt (Sertoli 1865, zitiert nach Griswold, 1998). Sie reichen von der Basalmembran bis zum Lumen und sind im basalen Bereich des Keimepithels über Tight junctions eng miteinander verbunden. Sie weisen einen großen, gelappten, meist im unteren Drittel liegenden Zellkern mit deutlichem Nucleolus auf. Die Proliferation der Sertoli-Zellen wird durch Gonadotropine aktiviert und erfolgt etwa bis zum 15. Lebensjahr (Weinbauer et al., 2010). Ihre Anzahl beim erwachsenen Mann ist demnach im Gegensatz zu den sich fortwährend teilenden Keimzellen festgelegt und im Schnitt kommen auf eine Sertoli-Zelle 10 Keimzellen (Zhengwei et al., 1998).

Die Sertoli-Zellen übernehmen im Keimepithel wichtige Aufgaben. Sie haben Stütz- und Ernährungsfunktionen für die Keimzellen, weshalb sie auch als ‚Ammenzellen‘ bezeichnet werden, und sind an der Abgabe der reifen Spermatiden aus dem Keimepithel (Spermiation) beteiligt. Sie sorgen für die Produktion der Tubulusflüssigkeit und sezernieren unter anderem Proteine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Steroide. Zudem übernehmen sie eine Schutzfunktion durch die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke (BHS), welche bei verschiedenen Säugetieren Anfang der 1970er Jahre (Fawcett et al., 1970; Dym und Fawcett, 1971) und beim Menschen von Koskimies et al. (1973) erstmals beschrieben wurde. Die Etablierung der BHS fällt mit den ersten meiotischen Teilungen der Keimzellen und dem damit verbundenen Proliferationsarrest der Sertoli-Zellen zusammen (Weinbauer et al., 2010). Durch die BHS wird das Keimepithel in zwei unterschiedliche Kompartimente unterteilt. Die haploiden Keimzellen im luminalen Kompartiment werden vor mutagenen Stoffen oder autoaggressiven Antikörpern geschützt und es herrscht ein für die Keimzellentwicklung entsprechendes Milieu. Eine weitere Funktion der Sertoli-Zellen besteht in der Übertragung hormoneller Stimuli auf die Keimzellen. Außerdem besitzen sie resorptive Fähigkeiten, indem

sie Residualkörper der abgegebenen Spermatiden, sowie degenerierende Spermatozyten und Spermatiden phagozytieren (Übersicht bei Holstein, 2008).

### 2.2.3 Leydig-Zellen

Die Steroidhormon-sezernierenden Zwischenzellen wurden im Jahr 1850 von Franz von Leydig erstmals beschrieben. Sie sind mit einem Anteil von 10-20 % die wichtigsten Zellen des Interstitiums. Im humanen Hoden sind ca.  $200 \times 10^6$  Leydig-Zellen zu finden (Weinbauer et al., 2010). Sie können sowohl vereinzelt, als auch in dichten Zellverbänden vorliegen. Man unterscheidet fetale, neonatale und adulte Leydig-Zellen, sowie Leydig-Vorgängerzellen und Leydig-Stammzellen, die sich jeweils in ihrer Entwicklung, Morphologie und Funktion voneinander unterscheiden. Fetale Leydig-Zellen gehen wahrscheinlich aus verschiedenen embryonalen Geweben hervor, so z.B. dem Zölomepithel, der Gonadenleiste, Mesonephronzellen und fetalen Nebennierenzellen. Diese Vorläuferzellen werden schon vor der 7. Schwangerschaftswoche funktionell aktiv, d.h. sie produzieren LH-unabhängig Testosteron. Die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen beginnt mit der 7. Schwangerschaftswoche und endet schließlich mit deren Rückentwicklung bzw. Involution bis zum Tag der Geburt, wobei beim Menschen noch nicht bekannt ist, welche Faktoren diese Leydigzell-Regression beeinflussen. Auch die anschließende Entwicklung der neonatalen und adulten Leydig-Zellen steht im Zusammenhang mit dem Plasmatestosteron-Gehalt (Übersicht bei Svechnikov et al., 2010).

Adulte Leydig-Zellen sind durch einen runden oder polygonalen Zellkörper sowie einen zentral liegenden Zellkern mit kleinem Nucleolus gekennzeichnet. Sie weisen zudem als charakteristische Merkmale Steroid-bildender Zellen viel glattes endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien vom tubulären Typ und Lipidtröpfchen auf. Letztere enthalten das Ausgangsmolekül für die Testosteronsynthese, das Cholesterol. Neben der wichtigen Produktion männlicher Sexualhormone synthetisieren sie Katecholamine, Neuropeptide und verschiedene Zytokine (Übersicht bei Holstein, 2008). Leydig-Zellen können postnatal aus peritubulären Leydig'schen Stammzellen sowie aus perivaskulären Zellen fortwährend nachgebildet werden. Dieser Prozess wird durch das Luteinisierende Hormon (LH) und durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der Sertoli-Zellen gesteuert (Übersicht bei Weinbauer et al., 2010).

### 2.2.4 Peritubuläre Myoidzellen

An die Basalmembran des Tubulus seminiferus schließt sich nach außen ein etwa 8  $\mu\text{m}$  dicker Mantel aus peritubulären Myoidzellen an. Diese Zellen weisen Differenzierungen von Fibroblasten und glatten Muskelzellen auf und werden daher auch als Myofibroblasten bezeichnet. Sie bewirken durch ihre Kontraktilität peristaltische Bewegungen an den Tubuli seminiferi und dadurch einen Transport der Spermatozoen in das Rete testis (Übersicht bei Holstein, 2008).

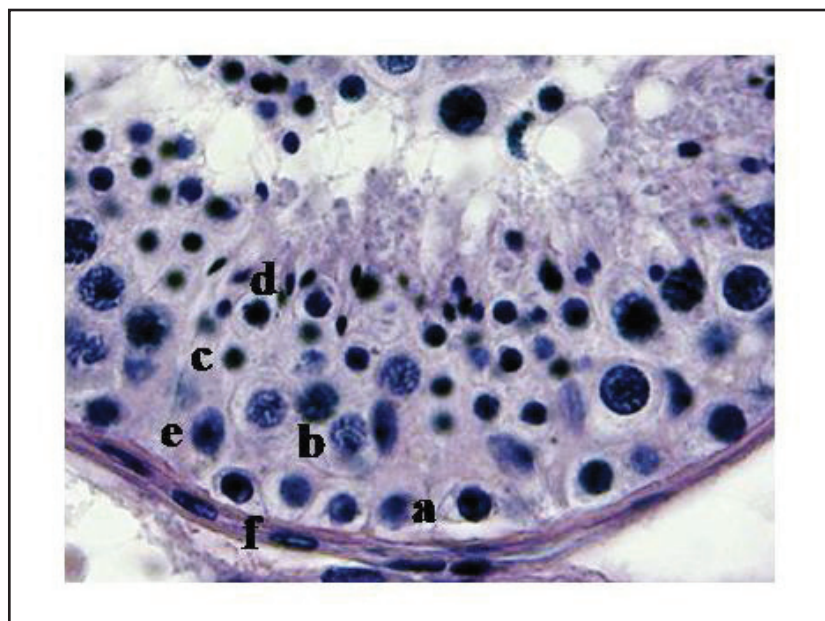
### 2.3 Ablauf der normalen Spermatogenese

Als Spermatogenese wird der gesamte Prozess der Keimzellbildung im Keimepithel des adulten Hodens bezeichnet (Abb. 2). Dabei entwickeln sich die auf der Tubuluswand sitzenden Spermatogonien zu reifen Spermien. Sie lässt sich in vier Phasen einteilen:

1. Proliferation und Differenzierung der Spermatogonien,
2. erste und zweite Reifeteilung der Spermatozyten,
3. Entwicklung der Spermatozoen aus haploiden runden Spermatiden (Spermiogenese),
4. Freisetzung der ausdifferenzierten Spermatiden in das Lumen des Keimtubulus (Spermiation).

Die Ausgangszellen der ersten Phase sind diploide Spermatogonien ( $2n$ ) mit einem doppelten Chromosomensatz ( $2C$ ), welche mitotisch aktiv sind. Ein Teil der Typ A-Spermatogonien stellt durch fortwährende Mitose einen lebenslangen Pool an Stammzellen dar. Ein anderer Teil differenziert sich in dieser ersten Phase der Spermatogenese zu Typ B-Spermatogonien. Diese sind ebenfalls mitotisch aktiv, entfernen sich nach Beendigung der Zellteilung von der Tubuluswand und treten in die Meiose ein. Der Eintritt in die Meiose und damit in die zweite Phase der Spermatogenese beginnt mit der Reduplikation des DNA-Gehaltes. Danach besteht jedes Chromosom aus zwei identischen Schwesterchromatiden ( $2n\ 4C$ ). Die Keimzellen werden nun als primäre Spermatozyten bezeichnet. In der 1. Reifeteilung werden die Chromosomen auf die beiden Tochterzellen (sekundäre Spermatozyten) verteilt ( $n\ 2C$ ). Diese treten kurze Zeit später in die 2. Reifeteilung ein, in der die Chromatiden eines jeden Chromosoms getrennt werden. Es sind haploide Spermatiden entstanden ( $n\ C$ ). Die dritte

Phase der Spermatogenese, in der die Differenzierung der haploiden Spermatiden zu reifen Spermien stattfindet, wird als Spermiogenese bezeichnet. Diese lässt sich ebenfalls in vier Phasen einteilen. In der ersten oder Golgi-Phase kommt es zur Ausbildung eines akrosomalen Vesikels. In der zweiten oder Kappenphase entsteht die akrosomale Kappe und es beginnt die Kernkondensation sowie die Ausbildung der Geißel. Die dritte oder akrosomale Phase ist charakterisiert durch die Differenzierung des Akrosoms und die Elongation von Kern und Körper. Die letzte Phase wird als Reifungsphase bezeichnet und beinhaltet die Differenzierung des spezie-spezifischen Akrosoms und des Kopfes sowie die Beendigung der Kernkondensation und der Zytoplasmareduktion. In der letzten Phase der Spermatogenese werden die ausdifferenzierten Spermatiden in das Lumen des Keimtubulus freigesetzt und nun als Spermatozoon bezeichnet (Übersicht bei Bergmann, 2006 und bei Bergmann und Kliesch, 2010).



**Abb. 2:** Normale Spermatogenese (Paraffin, HE, Primärvergrößerung x40).

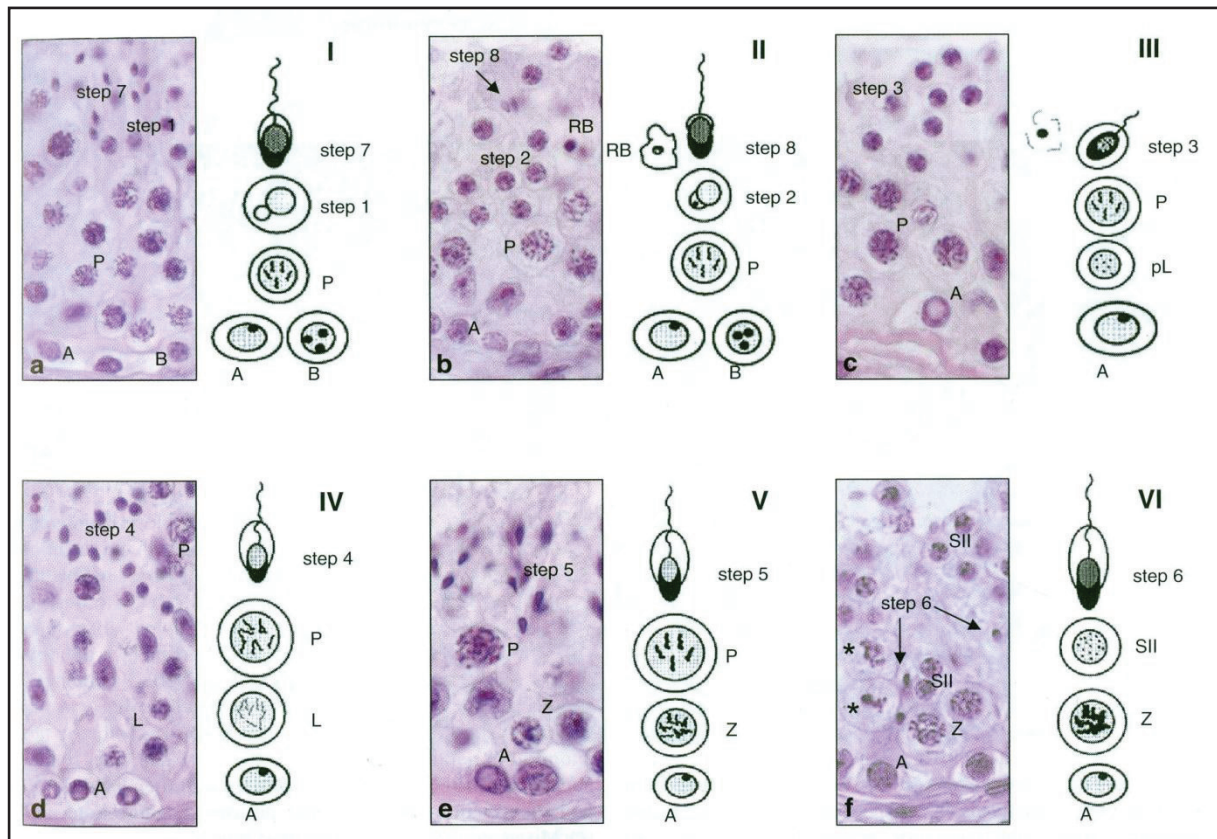
a = Spermatogonie, b = primäre pachytäne Spermatozyte, c = runde Spermatide, d = elongierte Spermatide, e = Sertoli-Zelle, f = peritubuläre Myoidzelle.

## 2.4 Kinetik der humanen Spermatogenese

Das Keimepithel zeigt im Querschnitt charakteristische Keimzellanordnungen, die unterschiedliche Entwicklungsstadien aufweisen. Beim Menschen kommen sechs Spermatogenesestadien vor, welche von Clermont (1963) definiert wurden (Abb. 3). Das Stadium I ist charakterisiert durch das Vorkommen von frühen runden Spermatiden mit einem Akrosombläschen. Außerdem differenzieren Spermatogonien vom Typ A zu Typ B-Spermatogonien. Im II. Stadium sind Residualkörper von Spermatiden innerhalb von Sertoli-Zellen nachweisbar. Im Anschluss an dieses Stadium findet die Spermiation statt. Im Stadium III beginnt die Kernkondensation von Spermatiden und die Typ B-Spermatogonie tritt in die Meiose ein. In den Stadien IV und V zeigt sich eine kontinuierliche Kondensation der Spermatidenkerne. Stadium IV ist zudem charakterisiert durch das Auftreten leptotäner primärer Spermatozyten, die sich im Stadium V zu pachytänen primären Spermatozyten weiterentwickeln. Nach Stadium V findet die erste meiotische Teilung statt. Stadium VI ist definiert durch das Auftreten von sekundären Spermatozyten. Am Ende dieses Stadiums findet die zweite meiotische Teilung statt.

Bei der Betrachtung eines Tubulus-Längsschnittes folgen die unterschiedlichen Spermatogenesestadien der Reihe nach aufeinander und jedes Stadium erstreckt sich über eine bestimmte Länge des Tubulus. Diese Stadium-Aneinanderreihung wird als sog. Spermatogenesewelle bezeichnet. Die Dauer der Spermatogenese beim Menschen beträgt etwa 74 Tage (Übersicht bei Bergmann, 2006 und bei Bergmann und Kliesch, 2010).





**Abb. 3:** Kinetik der humanen Spermatogenese (aus Bergmann und Kliesch, 2010).

(a) Stadium I, (b) Stadium II, (c) Stadium III, (d) Stadium IV, (e) Stadium V, (f) Stadium VI. A, B = Spermatogonie Typ A und Typ B; P = pachytäne primäre Spermatozyten; L = leptotäne primäre Spermatozyten; Z = zygotäne primäre Spermatozyten; SII = sekundäre Spermatozyten; step 1-8 = verschiedene Schritte der Spermiogenese; RB = Restkörperchen; \* = Zellen in der 1. meiotischen Teilung.

## 2.5 Störungen der humanen Spermatogenese

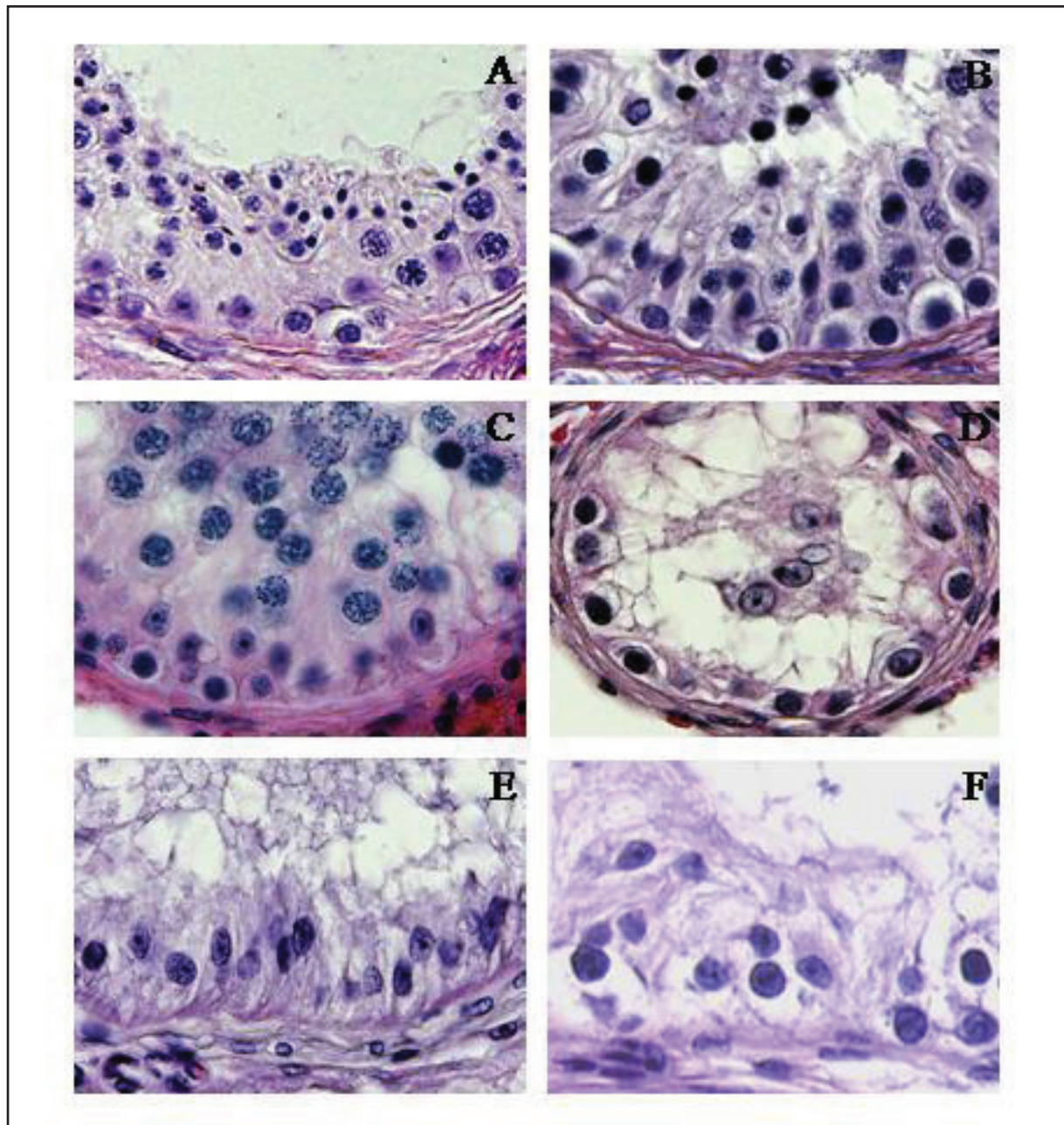
Spermatogenesestörungen als Ursache von Infertilität sind immer mit einem bestimmten histologischen Erscheinungsbild assoziiert. Dabei kann es sich um eine Hypospermatogenese (nur qualitativ intakte Spermatogenese, hyp), einen teilweise oder vollständig vorliegenden Arrest der Spermatogenese auf Stufe der runden Spermatiden (Spermatidenarrest, sda), primären Spermatozyten (Spermatozytenarrest, sza) oder Spermatogonien (Spermatogonienarrest, sga), ein vollständiges Fehlen der Keimzellen (Sertoli cell only-Syndrom, sco) oder eine totale Atrophie des Keimepithels (Tubulusschatten) handeln (Bergmann und Kliesch, 2010) (Abb. 4). Die unterschiedlichen Spermatogenesedefekte

können auch in benachbarten Keimtubuli eines Hodens nebeneinander auftreten, was als bunte Atrophie bezeichnet wird (Sigg, 1979).

Arreste der Spermatogenese treten bei Patienten mit Fertilitätsstörungen mit einer Häufigkeit von 4-30 % auf. Bei 293 Patienten des Universitätsklinikums Münster, bei denen eine diagnostische Hodenbiopsie vorgenommen wurde, zeigten 23 % einen Spermatogenese-arrest, hauptsächlich auf der Stufe der primären Spermatozyten. Bei fast einem Drittel der Patienten war der Defekt beidseitig vorhanden. Die Ursachen sind hierbei primär genetisch und sekundär auf endo- oder exogene Faktoren zurückzuführen (Nieschlag et al., 2010).

Der histopathologische Phänotyp des sco wurde im Jahr 1947 erstmals beschrieben (Del Castillo et al., 1947). Hierbei wird eine vollständige Keimzellaplasie von einem häufiger vorkommenden sog. fokalen sco (fsc) unterschieden. Bei letzterem kommen zwar zu einem geringen Prozentsatz Keimtubuli vor, die Keimzellen aufweisen, allerdings ist die Spermatogenese sowohl qualitativ als auch quantitativ nicht intakt. Etwa 30 % der infertilen Patienten, die sich einer Hodenbiopsie unterziehen, weisen ein fokales oder vollständiges sco auf, davon zu 8 % in beiden Hoden (Nieschlag et al., 2010). Neben endogenen und exogenen Faktoren, wie gestörtem Hodenabstieg, Infektionskrankheiten oder Medikamenten, gelten als wichtige Ursache für eine angeborene Keimzellaplasie Mikrodeletionen des Y-Chromosoms (Simoni et al., 2008).

Neben den oben genannten histopathologischen Erscheinungsbildern bei gestörter Spermatogenese tritt als obligate präinvasive Vorstufe für Seminome und Nicht-Seminome die sog. testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) auf. Sie ist charakterisiert durch das Vorkommen atypischer Spermatogonien-ähnlicher Zellen, die aus fetalen Keimzellen hervorgehen. Sie fallen durch ihre atypische Zellgröße, einen großen Zellkern, grobes Kern-Chromatin und die Präsenz mehrerer Nucleoli auf (Bergmann und Kliesch, 2010). Neben der histologischen Beurteilung erfolgt ein Nachweis der Tumorzellen, z.B. mittels immunhistochemischer Darstellung des Enzyms plazentare alkalische Phosphatase (PLAP) (Beckstaed, 1983). Die TIN kommt bei der gesunden Normalbevölkerung mit einer Häufigkeit von 0,5 % vor. Bei bestehendem Hodentumor findet sich die TIN zwischen 2-5 % im kontralateralen Hoden. Ohne therapeutische Intervention entwickelt sich in 70 % aller TIN-tragenden Hoden innerhalb von 7 Jahren ein invasiver Hodentumor (Schmoll et al., 2010).



**Abb. 4:** Störungen der humanen Spermatogenese (Paraffin, HE, Primärvergrößerung x40).

a = Hypospermatogenese,                      b = Spermatidenarrest,                      c = Spermatozytenarrest,  
 d = Spermatogonienarrest, e = Sertoli cell only-Syndrom, f = testikuläre intraepitheliale  
 Neoplasie.



## 2.6 Östrogene

Östron, Östriol und Östradiol (17 $\beta$ -Östradiol) gehören zu den wichtigsten physiologischen Östrogenen, wobei Östradiol das am stärksten wirksame natürliche Östrogen ist. Östrogene sind C<sub>18</sub>-Steroidhormone, die sich durch einen charakteristischen Phenol-A-Ring auszeichnen. In freier Form haben sie einen lipophilen Charakter, in konjugierter Form sind sie wasserlöslich. Östrogene kommen im Nerven-, Knochen- und Skelettmuskelgewebe genauso vor wie im Immun-, Gefäß- und endokrinen System. Sie können daher an der Entstehung und dem Verlauf unterschiedlicher Erkrankungen wie z.B. Krebs, Osteoporose, neurodegenerativen oder kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus oder Fettleibigkeit beteiligt sein (Übersicht bei Deroo und Korach, 2006).

Die Entdeckung des ersten Östrogens erfolgte durch Edward Albert Doisy und Adolf Butenandt, die 1929 unabhängig voneinander die Gewinnung von Östron publizierten. Als zweites Östrogen konnte Guy Frederic Marrian 1929 Östriol aus dem Urin von schwangeren Frauen isolieren. Ein Jahr später belegte Butenandt die nahe Verwandtschaft von Östron und Östriol. Östradiol wurde von Erwin Schwenk und Friedrich Hildebrandt 1932 erstmals dargestellt und 1938 von Hans Herloff Inhoffen aus Cholesterin synthetisiert (Übersicht bei Meyer, 2004). Die Entdeckung eines östrogenwirksamen Hormons im männlichen Organismus erfolgte erstmals 1934 durch Zondek, der es im Harn vom Hengst nachweisen konnte (Zondek, 1934). Jayle et al. (1962) waren die ersten, die zeigten, dass Östrogene im menschlichen Hoden synthetisiert werden. Payne et al. (1976) und Hendry et al. (1983) bestätigten die testikuläre Östrogensynthese beim Mann (Übersicht bei Carreau und Hess, 2010).

### 2.6.1 Biosynthese

Ausgangsprodukt der Östrogen-Biosynthese im weitesten Sinne ist Cholesterin, welches sich aus 27 Kohlenstoffatomen zusammensetzt. Zunächst wird eine C<sub>6</sub>-Einheit aus der Seitenkette des Cholesterins entfernt, wobei Pregnenolon entsteht. Diese Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon wird durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) des Hypophysenvorderlappens stimuliert. Durch Oxidation der 3-Hydroxylgruppe und Isomerisierung der  $\Delta_5$ -Doppelbindung zu einer  $\Delta_4$ -Doppelbindung wird aus Pregnenolon Progesteron. Durch Hydroxylierung an dessen C<sub>17</sub>-Atom und Abspaltung einer Seitenkette entsteht Androstendion. Dieses wird durch Reduktion der 17-Ketogruppe in Testosteron umgewandelt. Östrogene entstehen durch Abspaltung der C<sub>19</sub>-Methylgruppe und anschließende Aromatisierung des A-Rings unter Abspaltung von Formaldehyd. Hierbei wird Östron aus Androstendion und Östradiol aus Testosteron synthetisiert (Übersicht bei Stryer, 2007). Die Bildung von Androstendion bzw. Testosteron kann über zwei Synthesewege erfolgen. Nach der Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon entstehen sie im endoplasmatischen Retikulum sowohl aus Pregnenolon ( $\Delta_5$ -Syntheseweg), als auch aus Progesteron ( $\Delta_4$ -Syntheseweg). Auf unterschiedlichen Stufen können diese Schritte ineinander übergehen. Das Vorherrschen des einen oder anderen Weges variiert von Spezies zu Spezies. Bei der Ratte und bei der Maus überwiegt der  $\Delta_4$ -Syntheseweg, im humanen Hoden hingegen ist der  $\Delta_5$ -Syntheseweg von größerer Wichtigkeit (Übersicht bei Gower, 1988).

Im menschlichen Organismus werden Östrogene in den Ovarien, im Hoden, in der Plazenta, in der fetalen Leber, im Fettgewebe, in Chondrozyten, in Osteoblasten und in Teilen des ZNS synthetisiert (Übersicht bei O'Donnell, 2001). Das Enzym der Östrogenbiosynthese ist die Zytochrom P450-Aromatase, die im endoplasmatischen Retikulum zahlreicher Gewebe lokalisiert ist. Sie konnte im menschlichen Hoden in Leydig-Zellen (Brodie et al., 2001), in elongierten Spermatiden (Turner et al., 2002), in Zellen der Ductuli efferentes und des Nebenhodenkopfes (Carpino et al., 2004; beide zitiert nach Lambard und Carreau, 2005), in Sertoli-Zellen (Carreau et al., 2003) sowie in unreifen Keimzellen (Lambard et al., 2004) und ejakulierten Spermatozoen (Aquila et al., 2004; Rago et al., 2003; Lambard et al., 2004) nachgewiesen werden. Dieses Häm-Protein gehört zu der Zytochrom P450-Superfamilie und ist ein Produkt des CYP19-Gens. Die P450 Aromatase ist genau genommen ein mikrosomaler Enzymkomplex, der sich aus zwei Proteinen zusammensetzt, der NADPH-Zytochrom P450-Reduktase und der Zytochrom P450-Aromatase, welche die Häm-Gruppe und die Hormonbindungsstelle beinhaltet (Carreau et al., 2007).

Bei erwachsenen Männern werden ca. 30-50 µg Östradiol durch die Aromatisierung von Androgenen synthetisiert, wobei ca. 10-20 % direkt im Hoden selbst produziert werden (Übersicht bei Rochira et al., 2006).

Unmittelbar nach ihrer Synthese werden die Hormone ins Blutplasma abgegeben. Dort binden sie reversibel an Transportproteine, zu denen das Glykoprotein SHBG (Sexhormon-bindendes Globulin) und Albumin gehören. Durch diese Bindung sind sie vor einer unspezifischen Anlagerung an Membranen, einer beschleunigten Inaktivierung und einer verfrühten Ausscheidung geschützt.

### 2.6.2 Wirkungsweise

Freie Östrogene können aufgrund ihres lipophilen Charakters durch die Zellmembran der Zielzelle diffundieren (Muller et al., 1979) und dort über die Bindung an spezifische intrazelluläre Hormonrezeptoren ihre Wirkungen entfalten. Die Liganden-gebundenen Östrogenrezeptoren bilden Homodimere oder Heterodimere aus (Beato und Klug, 2000), wandern in den Kern und binden dort an bestimmte DNA-Sequenzen, die als „hormone response elements“ (HRE) bezeichnet werden. Die spezifische DNA-Sequenz wird vom Hormonrezeptor-Dimer mithilfe des Zinkfingermotivs erkannt. Dabei handelt es sich um cysteinreiche Bereiche im Rezeptorprotein, die  $Zn^{2+}$ -Ionen binden. Die Bindung des Hormonrezeptor-Dimers im Bereich der Promotor- oder Enhancer-Region eines hormonell kontrollierten Gens reguliert so dessen Transkription (Übersicht bei Alberts et al., 2004a).

Neben der klassischen genomischen Wirkungsweise, die mehrere Stunden dauern kann, können Östrogene auch schnelle Effekte, die innerhalb von Sekunden oder Minuten eintreten, hervorrufen. Schnelle östrogene Effekte konnten erstmals 1967 an ovariectomierten Ratten nachgewiesen (Szego und Davis, 1967) und 1975 durch Untersuchungen an Endometriumszellen unterstützt werden (Pietras und Szego, 1975; beide zitiert nach Hammes und Levin, 2007). Östrogene führen hierbei zu einer Aktivierung von Proteinkinasen (mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), Proteinkinase C (PKC)) und Phosphatasen, sowie zur Freisetzung von Kalzium und sekundären Botenstoffen wie z.B. cAMP (Übersicht bei Hammes und Levin, 2007 und Prossnitz und Barton, 2011). Die Wirkungen der Östrogene erfolgen in diesem Fall durch posttranslationale Veränderungen von Proteinen, hauptsächlich in Form von Phosphorylierungen. In Mitochondrien kommt es zu einer Rezeptorbindung an ERE-ähnliche Sequenzen der Mitochondrien-DNA und dadurch zu einer Erhöhung der entsprechenden

mRNAs (Übersicht bei Yager und Chen, 2007). Die Wirkungen werden in diesem Fall also durch transkriptionale Effekte hervorgerufen.

### **2.6.3 Östrogenwerte im Blut**

Östrogene kommen in gebundener oder freier Form im Blut vor. Studien, bei denen die Östrogenkonzentrationen im Blut von gesunden Männern gemessen wurden, zeigten Werte zwischen 79 und 147 pmol/l an (Hill et al., 1982; Andersson et al., 1993; Gann et al., 1996; Nagata et al., 2001). Carani et al. (1997) geben für Östradiol einen Referenzbereich zwischen 20 und 90 pg/ml (entspricht ca. 73-330 pmol/l), Herrmann et al. (2002) zwischen 20 und 50 pg/ml (entspricht ca. 73-183 pmol/l) und Rochira et al. (2006) zwischen 18 und 40 pg/ml (entspricht ca. 66-147 pmol/l) (Umrechnungsfaktor 3,671) an. Andere (www.labor-lademannbogen.de) geben Werte zwischen 13,5 und 59,5 pg/ml an, was umgerechnet ca. 49 und 218 pmol/l entspricht.

Östrogenkonzentrationen in Sperma von Männern liegen zwischen 14 und 249 pg/ml (Übersicht bei Hess et al., 2011).

### **2.6.4 Einfluss von Östrogenen auf Spermatogenese und Fertilität**

Beim Mann tritt physiologisch als Konsequenz des Alterns eine relative Östrogendefizienz auf, die allerdings weniger gravierend ist als bei Frauen nach der Menopause, da im Hoden weiterhin ausreichende Mengen Androgene synthetisiert und folglich in Östrogene umgewandelt werden (Rochira et al., 2006). Natürlicherweise auftretende Mutationen, die zu einer pathologischen Östrogendefizienz im männlichen Organismus führen, sind sehr selten. Ein Fall mit einer Mutation des ER $\alpha$ -Gens (Smith et al., 1994) und acht Fälle mit einer Dysfunktion des Aromatase-Gens CYP19 bei einem Jungen und sieben adulten Männern (Übersicht bei Rochira et al., 2002 sowie bei Rochira und Carani, 2009) sind bisher bekannt. Diese Patienten zeigten alle eine große Statur und Störungen im Knochenstoffwechsel. Andere Symptome, darunter auch eine verminderte Reproduktionsfunktion, waren von Fall zu Fall verschieden und unterschiedlich stark ausgeprägt (siehe Tab. 1 bei Rochira et al., 2002). Hierbei kamen eine 20-fache Verminderung der Spermienzahl, eine absolute Unbeweglichkeit der Spermien, sowie Keimzellarreste auf Stufe der primären Spermatozyten (Carani et al., 1997), eine Verminderung der Spermienlebensfähigkeit von nur 18 % (Smith et al., 1994),

sowie ein vollständiger Keimzellarrest (Rochira et al., 2002) vor. In anderen Fällen konnten keine Rückschlüsse auf den Grad der Fertilität eines Aromatase-defizienten Patienten gezogen werden, da Samenanalysen und Hodenbiopsien nicht vorgenommen wurden (Morishima et al., 1995). Andere Arbeitsgruppen zeigten eine signifikante Abnahme der Aromatase in unbeweglichen humanen Spermatozoen (Übersicht bei Carreau et al., 2007) und eine verbesserte Spermien-Motilität nach Östradiol-Zusatz (Übersicht bei Lambard und Carreau, 2005 sowie bei Carreau et al., 2011). Pentikäinen et al. (2000) zeigten, dass Östradiol als Antiapoptose-Faktor für humane Keimzellen in vitro fungiert.

Mit der Entwicklung unterschiedlicher Knockout-Tiermodelle (ER $\alpha$ KO, AromataseKO) konnte die Rolle der Östrogene für den männlichen Genitaltrakt besser erforscht werden. Mäuse mit entsprechenden Defekten waren infertil (z.B. Eddy et al., 1996; Robertson et al., 1999). ER $\alpha$ KO-Mäuse wiesen in der Produktion (geringere Anzahl an Spermien) sowie in der Funktion der Spermatozoen (herabgesetzte Motilität) und im Paarungsverhalten (normale Paarung, aber weniger Ejakulationen) Veränderungen auf, wenn sie mit Wildtyp-Mäusen oder heterozygoten Mäusen verglichen wurden (Eddy et al., 1996). Es zeigte sich, dass die männliche ER $\alpha$ KO-Maus aufgrund einer Beeinträchtigung der Flüssigkeitsrückresorption im proximalen Abschnitt der Ductuli efferentes und einer daraus resultierenden fortschreitenden Zerstörung der Keimzellen in den Keimtubuli infertil ist (Review von Hess, 2003). Die zunächst fertile männliche Aromatase-KO-Maus entwickelt eine fortschreitende Infertilität, die mit einer verminderten Reifung der Spermatiden und deren Reduktion einhergeht (Review von O'Donnell et al., 2001). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Akrosomenkappe abnormal entwickelt und es zu einer verminderten Motilität der Spermien und zu Keimzellarresten auf Stufe der Spermatiden kommt (Robertson et al., 1999).

Bei Versuchen zur Beurteilung der östrogenen Wirkungen auf die Keimzellentwicklung zeigten sich v.a. bei Ratten positive Effekte z.B. auf Spermatogenese, Keimzellanzahl, Spermatidendifferenzierung und Regeneration nach Bestrahlung (Übersicht bei Carreau et al., 2011).

## **2.7 Östrogenrezeptoren (ERs)**

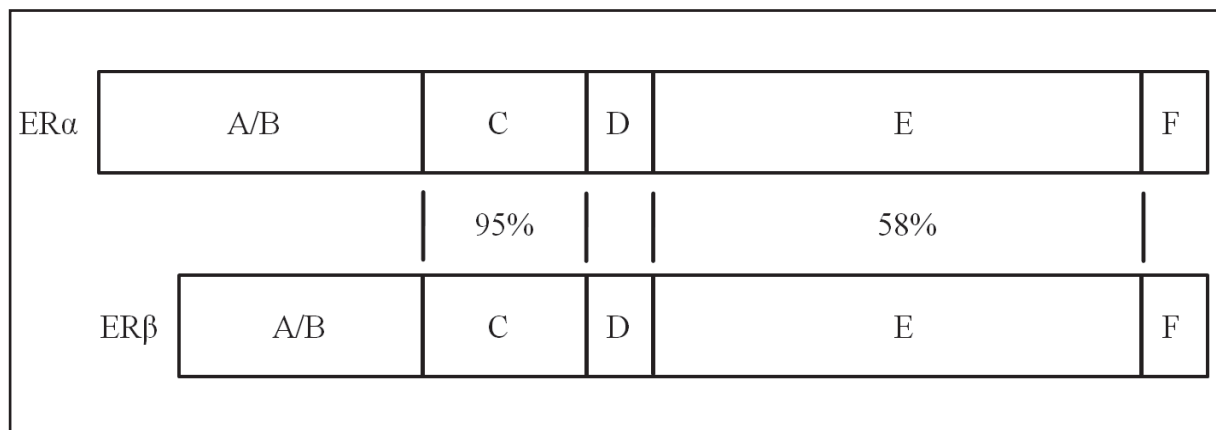
Östrogenrezeptoren sind Steroidhormonrezeptoren, die durch ihre charakteristische Struktur in die Klasse der Kernrezeptor-Unterfamilie 3 eingeordnet werden. Als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren vermitteln sie die Effekte von 17 $\beta$ -Östradiol. Alle Steroidhormonrezeptoren sind bausteinförmige Proteine, die in mehrere funktionelle

Domänen unterteilt werden können (Abb. 5). Die hochkonservierte DNA-bindende Domäne (DBD) (C) enthält zwei Zinkfinger, welche an der spezifischen DNA-Bindung und der Rezeptordimerisierung beteiligt sind. Die weniger konservierte Liganden-bindende Domäne (LBD) (E) beinhaltet unter anderem wichtige Regionen für die Ligandenbindung und die Rezeptordimerisierung. Die Domäne D wird als flexible Gelenkregion zwischen der DNA- und der Liganden-bindenden Domäne angesehen. Die N-terminale A/B-Domäne ist eine in Sequenz und Länge sehr variable Region und besitzt üblicherweise eine Transaktivierungsfunktion. Die C-terminale F-Domäne ist beim Progesteron-, Glukokortikoid- und Androgenrezeptor, nicht aber beim Östrogenrezeptor  $\alpha$ , essentiell für die Hormonbindung (Beato und Klug, 2000).

Es existieren zwei Subtypen von Östrogenrezeptoren. Im Jahr 1958 wurde der sogenannte ‚klassische‘ Östrogenrezeptor von Jensen entdeckt, in den 1960er Jahren im Uterus der Ratte identifiziert (Talwar et al., 1964; Soloff und Szego, 1969; zitiert nach Prossnitz und Barton, 2011) und schließlich in den 1980er Jahren kloniert (Walter et al., 1985; Green, 1986). Ein weiterer Östrogen-bindender Rezeptor konnte in den 1990er Jahren charakterisiert und kloniert werden (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Enmark et al., 1997). Dieser wurde folglich als ER $\beta$  und der ‚klassische‘ Östrogenrezeptor als ER $\alpha$  bezeichnet. Beide Rezeptoren binden die Liganden Östradiol, Diethylstilböstrol, Östriol und Östron mit hoher Affinität (Paech et al., 1997) und können Heterodimere ausbilden (Pettersson et al., 1997). Sie sind Produkte unterschiedlicher Gene, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, und werden deshalb nicht als Isoformen bezeichnet. Das humane ER $\alpha$ -Gen (ESR1) ist auf Chromosom 6 (Gosden et al., 1986) und das humane ER $\beta$ -Gen (ESR2) auf Chromosom 14 lokalisiert (Enmark et al., 1997). Sie besitzen eine Länge von 595 (ER $\alpha$ ) bzw. 530 (ER $\beta$ ) Aminosäuren. Ihre Sequenzhomologie ist für die DBD mit ca. 95 % und für die LBD mit ca. 58 % recht hoch (Marino et al., 2006; Enmark et al., 1997). Es sind zudem Isoformen beider Östrogenrezeptoren bekannt (für ER $\alpha$ : Flouriot et al., 2000; Lambard et al., 2004; Lambard und Carreau, 2005; für ER $\beta$ : Moore et al., 1998). Der leichteren Variante des ER $\alpha$  mit einem Molekulargewicht von 46 kDa fehlt Exon I (Flouriot et al., 2000).

Neben der vorherrschenden Lokalisation der Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) im Zellkern ist ein geringer Prozentsatz (ca. 5 %) im Zytoplasma zu finden (Edwards, 2005). Neben der Beeinflussung der Genexpression (sog. genomische Effekte) kommen auch schnelle Signalübertragungen (sog. nicht-genomische Effekte) vor, welche hauptsächlich über die G-Protein- oder Wachstumsfaktor-gekoppelten Signalwege vermittelt werden. Der G-Protein-gekoppelte Östrogenrezeptor (GPER) stellt ein integrales Membranprotein mit sieben

Transmembrandomänen dar. Er wurde in den 1990er Jahren von einigen Arbeitsgruppen kloniert und seine Expression konnte in unterschiedlichen Gewebearten (z.B. Lunge, Leber, Plazenta, Prostata, Ovarien) nachgewiesen werden. Bis zum Jahr 2000 wurde er als „waiser“ Rezeptor bezeichnet, da kein Ligand für ihn bekannt war. Filardo et al. (2000) führten schließlich Versuche durch, bei denen 17 $\beta$ -Östradiol als Ligand für diesen Rezeptor identifiziert werden konnte. Der GPER spielt sowohl indirekt bei der genomischen, als auch direkt bei der nicht-genomischen Wirkungsweise von Östrogenen eine Rolle (Übersicht bei Prossnitz und Barton, 2011).



**Abb. 5:** Vergleich der Proteinstrukturen des humanen ER $\alpha$  und ER $\beta$  (modifiziert nach Marino et al., 2006).

A/B = N-terminale Domäne , C = DNA-bindende Domäne, D = flexible Gelenkregion, E = Liganden-bindende Domäne, F = C-terminale Domäne; Homologien zwischen beiden Rezeptoren für die C-Domäne und die E-Domäne liegen bei ca. 95 % und 58 %.

## 2.8 Zelluläre Lokalisation und Expression des ER $\alpha$ im Hoden

Untersuchungen über die präzise zelluläre Lokalisation und Expression der Östrogenrezeptoren im Hoden verschiedener Spezies zeigen unterschiedlichste Ergebnisse. Differenzen gibt es hierbei nicht nur bei der Frage nach der Lokalisation und Expression innerhalb einer Spezies, sondern auch in Bezug auf den immunhistochemischen Nachweis der Rezeptoren und deren mRNA-Analysen aus testikulärem Gewebe oder Zellen (Übersicht bei Carreau und Hess, 2010).

Im menschlichen Hoden konnte der ER $\alpha$  teilweise nicht detektiert werden (Saunders et al., 2001; Mäkinen et al., 2001; Sierens et al., 2005). Mittlerweile scheint es jedoch unumstritten, dass beide ERs im humanen Hoden vorkommen. Allerdings sind die Ergebnisse über die Lokalisation des ER $\alpha$  sehr kontrovers (Übersicht in Tab. 1). Neben Untersuchungen des menschlichen Hodens liegen auch Daten über den Nachweis des ER $\alpha$  in menschlichem Ejakulat vor (Durkee et al., 1998; Aquila et al., 2004; Lambard et al., 2004; Solakidi et al., 2005; Lambard und Carreau, 2005).



**Tab. 1:** ER $\alpha$ -Lokalisation und -Expression im humanen Hoden. Leydig-Zellen (LZ), Sertoli-Zellen (SZ), Keimzellen (KZ), ER $\alpha$  nachweisbar [+], ER $\alpha$  schwach nachweisbar [(+)], ER $\alpha$  nicht nachweisbar [-].

Literatur	Material	Methode	Antikörper, Primer	Nachweis
Pelletier & El-Alfy, 2000	Paraffinschnitte	IHC	HC-20 (Santa Cruz Biotechnology)	+ (LZ)
Pentikäinen et al., 2000	Quetschpräparate	IHC	HC-20 (Santa Cruz Biotechnology)	+ (KZ)
			ER-6F11 (Novocastra)	+ (KZ)
			ER-1D5 (DAKO)	+ (KZ)
			HC-20 (Santa Cruz Biotechnology)	+ (80 kDa, 50-55 kDa)
	Hodengewebe	WB	H-184 (Santa Cruz)	+ (80 kDa, 60 kDa)
Taylor & Al-Azzawi, 2000	Paraffinschnitte	IHC	monoklonaler Maus-Anti-Rind-Antikörper (Upstate Biotechnology)	+ (LZ, SZ)
Saunders et al., 2001	Paraffinschnitte	IHC	ER-6F11 (Novocastra)	-
	Kryomaterial	WB	rekombinanter hER $\alpha$ (Pan Vera)	(+) (66 kDa)
Mäkinen et al., 2001	Kryoschnitte	IHC	ER-6F11 (Novocastra)	-
			ER-1D5 (DAKO)	-
			cDNA RT-PCR for 5' AATTTCAGATAATCGACGCCAG3', rev 5' GTGTTTCAACATTCTCCCTCCTC3'	-
Han et al., 2008	Paraffinschnitte	IF	F-10 (Santa Cruz Biotechnology)	+ (LZ, KZ)
	Hodengewebe	WB	F-10 (Santa Cruz Biotechnology)	+ (66 kDa)
Cavaco et al., 2009	Paraffinschnitte	IHC	MC-20 (Santa Cruz Biotechnology)	+ (LZ, SZ, KZ)
	Hodengewebe	RT-PCR	for 5' AATTTCAGATAATCGACGCCAG3', rev 5' GTGTTTCAACATTCTCCCTCCTC3'	+
Filipiak et al., 2012	Paraffingewebe	IHC	N 1575 (DAKO)	+ (LZ, SZ)

## 2.9 Zellzyklus und Proliferationsmarker Ki-67

Untersuchungen in den 1950er Jahren von Howard und Pelc zeigten, dass teilungsaktive Zellen einem Zellzyklus unterliegen, der in unterschiedliche Phasen unterteilt werden kann (Übersicht bei Hall und Levison, 1990). Während des Zellzyklus finden die Verdopplung der DNA und die Aufteilung der Kopien auf zwei identische Tochterzellen statt. Nach Beendigung der Mitose (M-Phase) treten die Zellen in die sog. G<sub>1</sub>-Phase (G = gap) des nächsten Zellzyklus ein, in welcher die Synthese der DNA vorbereitet wird. Während der darauffolgenden Synthese-Phase (S-Phase) wird der DNA-Gehalt des Zellkerns schließlich verdoppelt. In der G<sub>2</sub>-Phase erfolgt die Synthese von Molekülen, die für die korrekte Durchführung der Mitose nötig sind (z.B. der Spindelapparat). Die G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase werden zum Begriff der Interphase zusammengefasst, welche den Großteil des Zellzyklus ausmacht (Übersicht bei Alberts et al., 2004b). Zellen können auch, z.B. unter ungünstigen Umweltbedingungen, in eine Art Ruhezustand verfallen, der als G<sub>0</sub>-Phase bezeichnet wird und erstmals von Lajtha (1963; zitiert nach Hall und Levison, 1990) erwähnt wurde.

Zur Beurteilung der zellulären mitotischen Aktivität können unterschiedliche Methoden angewendet werden. Sie reichen von der simplen morphologischen Untersuchung der Zellen auf Mitosefiguren über die Bestimmung des DNA-Gehaltes mittels Thymidin, Bromdeoxyuridin oder Durchflusszytometrie bis hin zu immunhistochemischen Methoden oder dem Nachweis von sogenannten ‚nucleolar organiser regions‘. Diese Methoden weisen sowohl Vor- als auch Nachteile in ihrer Durchführbarkeit sowie Auswertbarkeit auf (Übersicht bei Hall und Levison, 1990).

Eine der bekanntesten Methoden zur Beurteilung der zellulären Proliferation ist der Nachweis des Ki-67-Antigens mittels gleichnamigem Antikörper. Das Ki-67-Antigen wurde Anfang der 1980er Jahre von Gerdes et al. (1983) nachgewiesen und das Protein konnte 1991 (Gerdes et al., 1991) identifiziert werden. Die vollständige Primärstruktur des Proteins wurde zwei Jahre später durch Schlüter et al. (1993) bekannt. Der Name Ki-67 steht für die Stadt Kiel und für den ursprünglichen Zellklon, der den gleichnamigen Antikörper gegen das Protein produziert hat. Das Protein wird während der G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase exprimiert und hat sein Expressionsmaximum in der G<sub>2</sub>- und der frühen M-Phase (Gerdes et al., 1984; Sasaki et al., 1987), konnte allerdings nicht in der frühen G<sub>1</sub>-Phase sowie während DNA-Reparaturprozessen detektiert werden (Hall et al., 1993; Kubbutat et al., 1994). Der Nachweis des Ki-67-Proteins wurde mit der Einführung eines neuen monoklonalen Antikörpers (MIB-1, Key et al., 1993) auch an Formalin-fixiertem Paraffingewebe möglich (Cattoretti et al., 1992).

und spielt heute eine wichtige Rolle in der Tumordiagnostik (Übersicht bei Scholzen und Gerdes, 2000).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Probenumfang**

In dieser Arbeit wurde humanes Hodengewebe aus der Biopsiebank des Institutes für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht. Die Patienten wurden im Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie (CeRA) des Universitätsklinikums Münster aufgrund von normo- oder hypergonadotroper Azoospermie oder obstruktiver Azoospermie nach Vasektomie vorstellig (Übersicht bei Bergmann und Kliesch, 2010).

Nach schriftlicher Einverständniserklärung und einer sorgfältigen klinischen Untersuchung wurden zwei Spermaanalysen gemäß WHO-Richtlinien (2010) durchgeführt. Zusätzlich wurde im CeRA bei allen Patienten die 17 $\beta$ -Östradiol-Konzentration mittels Immunofluoreszenz-Photometrie aus Serumproben bestimmt und dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Serum-Östrogenwerte von  $\geq 250$  pmol/l wurden als erhöht angesehen (Zitzmann et al., 2006). Anschließend erfolgte der operative Eingriff zur Entnahme des Hodengewebes unter Allgemeinanästhesie.

Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 70 Patienten (Tab. 2).

**Tab. 2:** Probenumfang und Methodik.

Methode	Material	biologische    technische		Diagnose
		Replikate		
IHC ERα	Paraffinschnitte	3	1	nsp
		3	1	TIN
RT-Nested-PCR ERα und				
StAR nach IHC ERα und	Paraffinschnitte	3	1	nsp
UV-LAM				
IB ERα	Hodenhomogenat	3	1	nsp
ISH ERα	Paraffinschnitte	3	1	nsp
RT-PCR nach UV-LAM	Gefrierschnitte	3	1	nsp
		3	1	sco
RT-qPCR ERα (ERβ, GPER)	Paraffinschnitte	5(5)	3	nsp
		5 (0)	3	sda
		5 (5)	3	sza
		5 (5)	3	sga
		5 (5)	3	sco
IHC Ki-67	Paraffinschnitte	3	1	nsp, hyp,
				sda, sza, sga

Für alle qualitativen Nachweise wurden 3 Proben von Patienten mit normaler Spermatogenese (nsp), Sertoli cell only-Syndrom (sco) oder testikulärer intraepithelialer Neoplasie (TIN) verwendet. Mittels quantitativer RT-PCR wurden 25 bzw. 20 Biopsien mit unterschiedlichen histologischen Diagnosen (nsp, Spermatidenarrest (sda), Spermatozytenarrest (sda), Spermatogonienarrest (sga) und sco) analysiert. Mittels histomorphometrischer Analyse von Ki-67-gefärbten Schnitten wurden 27 Biopsien von 24 Patienten ausgewertet. Hierbei handelte es sich ebenfalls um Biopsien mit unterschiedlichen histologischen Diagnosen (nsp, Hypospermatogenese (hyp), sda, sza und sga).

### **3.2 Probengewinnung**

Pro Hoden wurden drei Biopsien, jede mit etwa der Größe eines Reiskorns, von unterschiedlichen Lokalisationen entnommen. Eine Probe wurde in Bouin'sche Lösung überführt und in Paraffin eingebettet und zwei Proben wurden in einem sterilen 2 ml Schraubdeckeltube in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

#### **3.2.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinschnitte)**

##### **3.2.1.1 Fixation in Bouin'scher Lösung**

Für die HE-Färbungen sowie verschiedene immunhistochemische Nachweise wurden die Hodenbiopsien direkt nach Entnahme in Bouin'sche Lösung verbracht. Diese Art der Gewebefixierung hat den Vorteil einer guten Strukturhaltung des Hodengewebes. Die Gewebeproben wurden für 24 h in Bouin'scher Lösung fixiert und anschließend täglich über 5 Tage mit 70%igem Ethanol gespült.

##### **3.2.1.2 Entwässerung der Proben**

Die Proben wurden nach Entfernung der Fixierflüssigkeit in Biopsiekörbchen verbracht und mit dem Entwässerungsgerät Leica TP 1050 (Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert sowie anschließend via Xylol mit Paraffin durchtränkt.

Die Proben durchliefen dabei folgendes Programm:

- Ethanol 80% und Ethanol 96% für jeweils 2 h
- 3 x Ethanol 100% für jeweils 3 h
- Xylol für 1 h
- 2 x Xylol für jeweils 45 min
- 3 x Paraffin (59°C) für jeweils 40 min

### **3.2.1.3 Einbettung der Proben**

Das Einbetten der Gewebeproben in Paraffin erfolgte mit Hilfe des Einbettgerätes Leica EG 1160. Zunächst wurden die Proben in Stahlförmchen verbracht und anschließend mit 60°C-warmem Paraffin übergossen. Die Abkühlung und Härtung des Paraffins erfolgten auf der Kühlplatte des Gerätes.

### **3.2.1.4 Beschichtung der Objektträger (OT)**

Um eine bessere Haftfähigkeit der Paraffinschnitte auf den Glas-OT zu erreichen, wurde deren Beschichtung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) vorgenommen.

Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- OT kurz in reinem Aceton inkubieren
- Aceton unter laufendem Abzug vollständig verdampfen lassen
- OT für 4 min in 2%igem APES inkubieren
- OT für 4 min in Leitungswasser stellen und anschließend für 4 min in fließendem Leitungswasser spülen
- OT für 4 min in Aqua bidest stellen
- OT über Nacht bei 37°C im Trockenschrank trocknen

### **3.2.1.5 Herstellung der Paraffinschnitte**

Von den in Paraffin eingebetteten Biopsien wurden mittels Schlittenmikrotom (Leica SM 2000 R) 5 µm dünne Schnitte angefertigt, zur Streckung in ein mit Aqua bidest gefülltes 37°C warmes Wasserbad gelegt und anschließend auf APES-beschichtete OT verbracht. Die Schnitte trockneten über Nacht in einem Trockenschrank bei 37°C und wurden bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.2.1.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Um die histologische Beschaffenheit (= Diagnose) und die Gewebeerhaltung der jeweiligen Probe beurteilen zu können, wurden von allen Paraffinpräparaten H.E.-Färbungen angefertigt. Die Zellkerne wurden durch basisches Hämalaun blau-violett angefärbt, alle anderen Strukturen (Zytoplasma, interstitielles Gewebe) erschienen durch den sauren Farbstoff Eosin in verschiedenen Farbabstufungen rot.

Es wurde nach folgendem Färbeprotokoll vorgegangen:

- Entparaffinierung und Rehydrierung der Hodenschnitte
  - OT 3 x 10 min in Xylol inkubieren
  - OT jeweils 5 Minuten in 100%igem, 96%igem, 80%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol inkubieren
- Spülen der Präparate in Aqua dest für 1 x 5 min
- Färbung der Hodenschnitte
  - 10 bis 20 sec in Hämatoxylin färben
  - für 10 min unter fließendem Leitungswasser bläuen
  - anschließend für mind. 7 min in gefiltertem Eosin färben
  - kurz in Leitungswasser spülen
- Dehydrierung der Hodenschnitte
  - kurz in 70%iges und 80%iges Ethanol tauchen
  - 2 min in 80%igem Ethanol inkubieren
  - 2 x 2 min in 90%igem Ethanol inkubieren
  - 3 x 2 min in 100%igem Ethanol inkubieren
  - 3 x 10 min in Xylol inkubieren
- Eindecken der Hodenschnitte mit Vitro-Clud®



### **3.2.2 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Gefrierschnitte)**

#### **3.2.2.1 Vorbereitungen**

- RNase-freien Arbeitsplatz und RNase-freie Arbeitsgeräte sicherstellen
- Messer in die Messerhalterung des Gefriermikrotoms einspannen, so dass es die entsprechende Temperatur annimmt
- Metall-Objektträger auf Halterung in Gefriermikrotombox legen
- Proben aus dem -80°C-Gefrierschrank in flüssigen Stickstoff überführen

Das Aufnehmen der Gefrierschnitte erfolgte auf mit einer Membran überzogenen Objektträger (P.A.L.M Membran Slide), welche zuvor für 30 min unter der Sterilbank mit UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) bestrahlt wurden.

Die bei -80°C konservierten Gewebeproben wurden mit Hilfe des wasserlöslichen Gewebeklebstoffes Tissue-Tek® mittig und gerade auf einem Metall-Objektträger befestigt.

#### **3.2.2.2 Herstellung der Gefrierschnitte**

- Metall-Objektträger einspannen, so dass das Gewebe in Längsrichtung geschnitten werden kann
- Schnitte mit einer Dicke von 9 µm auf die vorbereiteten P.A.L.M Membran Slide Objektträger aufnehmen
- Kühltemperatur: -28°C bis -30°C
- Objekttemperatur: -20°C bis -22°C

Zur Bestätigung der histologischen Diagnose und zur Beurteilung der Gewebeerhaltung wurde jeweils der erste unfixierte, luftgetrocknete Gefrierschnitt einer jeden Probe auf einen unbeschichteten Objektträger verbracht und eine Schnelfärbung mit Hämatoxylin vorgenommen.

### 3.2.2.3 Fixation der Gefrierschnitte

- Schnitte 1 min bei RT trocknen lassen
- Schnitte für 40 sec mit Hämatoxylin überschichten, anschließend mit DEPC-Wasser abspülen
- Schnitte 30 sec mit DEPC-Wasser überschichten
- Schnitte für jeweils 10 sec mit 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol überschichten

### 3.3 Nachweis der ER $\alpha$ -Expression mittels RT-PCR nach UV-LAM

Es wurden Gefrierschnitte mit nsp oder sco verwendet. Dabei wurden jeweils Tubuli und Interstitium getrennt voneinander gepickt.

#### 3.3.1 UV-LAM

Die UV-LAM erfolgte unter Verwendung des Palm® MicroBeam Systems, welches sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

- inverses Hochleistungsmikroskop (Axiovert 135)
- motorisierter und über eine Computermouse steuerbarer Objektisch
- mit dem Computer sowie mit dem Mikroskop verbundener integrierter Laser (Nitrogen/Stickstoff-Laser 337) zum Ausschneiden des gewünschten Gewebes
- mit dem Computer verbundene Colour Video Camera
- Software (Palm® Robo Software) zur Steuerung der Mikrodissektion

Zunächst wurden mittels Mikroskop bzw. Monitor auf dem Gefrierschnitt geeignete Strukturen (Tubuli oder Interstitium) ausgewählt und mit Hilfe der Software markiert. Anschließend wurde das markierte Gewebe durch den Laser freigeschnitten und mittels ‚Laser-Pressure Catapulting‘ in den Deckel des entsprechend platzierten Tubes katapultiert. Das Tube mit dem gepickten Gewebe wurde in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Mittels dieser Technik konnten einzelne Tubuli oder Interstitium separat aus dem übrigen Hodengewebe herausgeschnitten werden.

Nachbereitung des gepickten Materials:

- 5 µl Träger-RNA (poly-A-RNA, aus dem RNeasy Micro Kit (Cat.No.74004), Arbeitslösung: 4 ng/µl) und 345 µl RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol in das LPC-Tube geben
- Tube für 30 sec pulsatil auf dem Kopf vortexen
- Tube zentrifugieren und bei -80°C tiefgefrieren

### **3.3.2 RNA-Extraktion aus mikrodisektiertem Gewebe mit dem RNeasy Micro Kit (Cat.No. 74004)**

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- in Schraubdeckel-Tubes mit gepickten und aufbereiteten Zellen 350 µl 70%iges Ethanol (angesetzt mit RNase-freiem Wasser) geben und mit der Pipette gut mischen
- Probe in Zentrifugen-Röhrchen (RNeasy MinElute Spin Column), welches in einem 2 ml Sammelgefäß steckt, überführen und für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren, anschließend Filtrat verwerfen
- 700 µl RW1-Puffer (RNeasy Micro Kit) hinzufügen und für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren
- Filtrat und Eppendorf-Tube verwerfen, Säule in ein neues 2 ml Eppendorf-Tube überführen
- 500 µl RPE-Puffer (RNeasy Micro Kit) hinzufügen und für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren
- Filtrat verwerfen
- 500 µl 80%iges Ethanol (mit RNase-freiem Wasser angesetzt) hinzufügen und für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugieren
- Filtrat und Eppendorf-Tube verwerfen, Säule in ein neues 2 ml Eppendorf-Tube überführen
- Säule mit geöffnetem Deckel 5 min bei 14.000 rpm zentrifugieren

- Filtrat und Eppendorf-Tube verwerfen, Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführen
- 14 µl RNase-freies Wasser hinzufügen
- für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugieren
- Säule verwerfen und Flüssigkeit in ein neues RNase-freies Schraubdeckel-Tube überführen

### 3.3.3 RT-PCR

#### 3.3.3.1 DNase-Verdau

Um sicherzustellen, dass nach der Extraktion von RNA keine Verunreinigung mit genomischer DNA (gDNA) vorlag, wurde eine Behandlung mit DNase I vorgenommen. Um einen gleichzeitigen Verdau der RNA zu vermeiden, wurde dem DNase-Mix ein RNase-Inhibitor zugefügt.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- DNase-Mix herstellen:
  - 1 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
  - 1 µl 10x PCR-Puffer Gold (10 mM)
  - 1 µl DNase I, RNase-frei (10 U/µl)
  - 0,25 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl)
- 3,25 µl DNase-Mix mit 6,65 µl RNA-Lösung mischen
- der Ansatz (9,9 µl) durchlief im T3 Thermocycler folgendes Programm:
  - Schritt 1: 10 min bei 37°C inkubieren, um genomische DNA zu verdauen
  - Schritt 2: 5 min bei 75°C inkubieren, um DNase zu deaktivieren und abzubauen
- anschließend wurde die behandelte RNA sofort weiterverarbeitet

### 3.3.3.2 Reverse Transkription (RT)

Mit der RT wurde aus der DNase-behandelten RNA cDNA synthetisiert. Hierbei wurden Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), das Enzym Reverse Transkriptase und Random Hexamer-Primer als Startermoleküle für das Enzym verwendet.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- RT-Mix herstellen:
  - 2,2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
  - 1,1 µl 10 x PCR-Puffer Gold (10 mM)
  - 4,4 µl Nukleotid-Mix (10 mM)
  - 0,55 µl Random Hexamers (50 µM)
  - 0,55 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl)
  - 0,55 µl Reverse Transkriptase MultiScribe® (50 U/µl)
- 9,35 µl RT-Mix mit 1,65 µl DNase-verdauter RNA mischen
- der Ansatz (11,0 µl) durchlief im T3 Thermocycler folgendes Programm:
  - Schritt 1: 8 min bei 21°C inkubieren, zur Anlagerung der Random Hexamers
  - Schritt 2: 15 min bei 42°C inkubieren, zur Umschreibung der RNA in cDNA durch die Reverse Transkriptase
  - Schritt 3: 5 min bei 99°C inkubieren, zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase
  - Schritt 4: 5 min bei 5°C inkubieren, zur Abkühlung der Produkte
  - entstandene cDNA bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C lagern

Um sicher zu stellen, dass der DNase-Verdau erfolgreich war, wurde eine sogenannte -RT-Kontrolle durchgeführt. Hierbei wurde in einem Ansatz mit der behandelten RNA-Lösung das Enzym Reverse Transkriptase durch die gleiche Menge steriles Aqua bidest ersetzt. Bei der anschließenden PCR und Agarose-Gelelektrophorese sollte in der -RT-Kontrolle kein Signal detektiert werden, da weder gDNA noch umgeschriebene cDNA vorhanden sind.

### 3.3.3.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung der DNA *in vitro*. Mithilfe der DNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Desoxyribonukleotidtriphosphate (im Überschuss bei der Reversen Transkription zugesetzt) und der Vorwärts- und Rückwärts-Primer entstehen an dem denaturierten DNA-Doppelstrang zwei neue Einzelstränge. Die Produkte eines jeden Zyklus dienen als Vorlage für die nachfolgenden Zyklen.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Prä-Mix herstellen:
  - 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
  - 4 µl 10 x PCR-Puffer Gold (10 mM)
  - 32,75 µl steriles Aqua bidest
- Primer-Mix herstellen:
  - 38,75 µl Prä-Mix
  - 1 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
  - 1 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
  - 0,25 µl AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/µl)
- 40 µl Primer-Mix mit 10 µl cDNA in einem 650 µl Eppendorf-Tube mischen
- im T3 Thermocycler wurde folgendes Programm durchlaufen:
  - Schritt 1: 2 min bei 95°C inkubieren, zur Aktivierung der Polymerase
  - Schritt 2: 30 sec bei 95°C inkubieren, zur Auftrennung der DNA-Doppelhelix
  - Schritt 3: 30 sec bei X°C inkubieren (Temperatur variiert je nach Primer und ist abhängig von der Basenzusammensetzung), zur Anlagerung der Primer
  - Schritt 4: 30 sec bei 72°C inkubieren, zur Amplifikation des DNA-Stranges
  - Schritt 2-4 39 x wiederholen
  - Schritt 5: 7 min bei 72°C, zur endgültigen Amplifikation
- Primerpaare:

Alle Primerpaare wurden von der Firma MWG Biotech GmbH, Ebersberg synthetisiert. Als interne Kontrolle wurde jede Probe mittels des Referenzgens  $\beta$ -Aktin überprüft. Die Expression dieses Gens ist unabhängig von der histologischen Diagnose

der zu untersuchenden Hodenbiopsie (normale Spermatogenese versus Spermatogenesestörungen). Die Schmelztemperatur der Primer lag bei 60°C. Die Primersequenzen sind in Tab. 3 aufgelistet.

**Tab. 3:** Primersequenzen RT-PCR ER $\alpha$ .

Name	Primersequenz	NCBI Accession Number	Produktlänge
ER $\alpha$	for 5' - GGAGGGCAGGGGTGAA - 3' rev 5' - GGCCAGGCTGTTCTTCTTAG - 3'	NM_000125	102 bp
$\beta$ -Aktin	for 5' - TTCCTTCTTGGGCATGGAGT - 3' rev 5' - TACAGGTCTTTGCGGATGTC - 3'	NM_001101.3	90 bp

### 3.3.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Kontrolle der RT-PCR und zur Visualisierung des PCR-Produkts wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Herstellung von TAE-Puffer (pH 8,0) für Sybr Green
- Herstellung des 2%igen Agarosegels
  - 1 g Agarose in 50 ml 1 x TAE-Puffer (pH 8,0) suspendieren
  - in der Mikrowelle solange aufkochen, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat
  - kurze Zeit abkühlen lassen
  - 5  $\mu$ l Farbstoff Sybr Green I hinzufügen und mit der Agarose-Lösung vermischen
  - Agarose-Lösung luftblasenfrei in das vorbereitete Geltablett gießen und erstarren lassen, anschließend Gelkamm und Gummi-Endblöcke entfernen
  - Geltablett in Elektrophoresekammer legen und mit TAE-Puffer (10 x) bedecken
- Vorbereitung und Laden des Markers
 

Zur Bestimmung der Fragmentgröße der aufgetrennten PCR-Amplifikate wurde ein DNA-Größenstandard (100 bp-Marker, 1:10 mit Aqua bidest verdünnt) verwendet.

  - Markergemisch: 2  $\mu$ l Loading Buffer, 9  $\mu$ l Aqua bidest und 1  $\mu$ l 100 bp-Marker

- Markergemisch in die erste Geltasche pipettieren
- Probenvorbereitung und Laden der Proben
  - Probengemisch: 15 µl PCR-Produkt und 3 µl Loading Buffer
  - Probengemisch in Geltaschen pipettieren
- Gelelektrophorese
  - Elektrophorese für 35 min bei einer Spannung von 125 Volt laufen lassen

Gel in Transilluminator UVsolo L legen und elektrophoretisch getrennte Proben mittels UV-Licht detektieren und photographieren.

### **3.4 Nachweis der zellulären Lokalisation des ER $\alpha$ auf mRNA-Ebene mittels *In-situ*-Hybridisierung (ISH)**

In den folgenden Abschnitten wird der Nachweis des ER $\alpha$  auf mRNA-Ebene an Paraffinschnitten (Herstellung siehe Kapitel 3.2.1) mit nsp mittels ISH beschrieben.

#### **3.4.1 Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA-Sonden**

##### **3.4.1.1 Extraktion und Isolation von RNA aus Gefriermaterial**

Für die Extraktion und Isolation der RNA wurde Gefriermaterial verwendet, welches unmittelbar nach operativer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde. Hierbei handelte es sich um Hodenbiopsien von Patienten mit nsp.

##### **3.4.1.1.1 Vorbereitungen**

- RNase-freien Arbeitsplatz und RNase-freie Arbeitsgeräte sicherstellen
- DEPC-Wasser zur Herstellung von RNase-freien Lösungen verwenden
- Glaswaren und Metallgegenstände (z.B. Spatel) bei 180 - 200 °C für 4 h inkubieren
- RNase-freie Mikroreaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwenden
- Lösungen, die mit DEPC-Wasser angesetzt wurden, zur vollständigen Zersetzung des DEPC bei 100 °C für 30 min autoklavieren (DEPC verändert die RNA durch Carboxylierung von Purinbasen)



#### **3.4.1.1.2 RNA-Extraktion mit TRIzol® Reagent**

- Gewebe in einer Porzellanschale mit flüssigem Stickstoff mörsern
- ca. 100 mg des Gewebes abwiegen und in ein 2 ml Eppendorf-Tube mit 1 ml TRIzol® Reagent überführen
- Gewebe mit einem Ultra-Turrax auf höchster Stufe (12.000 rpm) für 30 Sekunden homogenisieren
- 5 min bei RT stehen lassen
- 200 µl Trichlormethan zugeben, schütteln und 5 min bei RT stehen lassen
- 15 min bei 4°C bei 140.000 rpm zentrifugieren

Als Ergebnis war eine Trennung in drei unterschiedliche Phasen zu erkennen. Die obere wässrige Phase war farblos (RNA), die mittlere Phase war weiß (Proteine) und die untere organische Phase war rot (DNA).

#### **3.4.1.1.3 Isolation der RNA**

- Präzipitation
  - obere Phase (RNA) abpipettieren und in ein neues Eppendorf-Tube überführen
  - gleiche Menge (ca. 500 µl) Isopropanol hinzufügen und vortexen
  - 30 min bei -20°C stehen lassen und anschließend vortexen
  - 10 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugieren

Das Ergebnis waren ein Pellet (RNA) und flüssiger Überstand.

- Waschen
  - Überstand verwerfen
  - Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol in DEPC (-20°C) lösen
  - 10 min in Eiswasser stellen und anschließend vortexen
  - 10 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugieren
  - diesen Schritt 1 x wiederholen

Das Ergebnis waren ein Pellet und flüssiger Überstand.

- Resuspendieren
  - Überstand verwerfen
  - Pellet ca. 30-60 min im Trockenschrank trocknen
  - Pellet bei 70°C im Wasserbad in 50 µl DEPC-Wasser resuspendieren

Anschließend erfolgte die Messung der extrahierten RNA mittels Absorptions-Einstrahlphotometrie unter Verwendung eines BioPhotometers (siehe Kapitel 3.6.2). Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNA bei -80°C tiefgefroren.

#### **3.4.1.1.4 RT-PCR**

Die Protokolle für DNase-Verdau, Reverse Transkription und PCR wurden wie im Kapitel 3.3.3 beschrieben vorgenommen.

Das Programm für die RT-PCR lautete wie folgt:

- Schritt 1: 10 min bei 95°C inkubieren
- Schritt 2: 45 sec bei 94°C inkubieren
- Schritt 3: 1 min bei X°C inkubieren (variiert je nach Primer)
- Schritt 4: 1.30 min bei 72°C inkubieren
- Schritt 2-4 35 x wiederholen
- Schritt 5: 10 min bei 72°C

#### **3.4.1.1.5 Aufreinigung des PCR-Fragmentes**

Zur Aufreinigung des PCR-Fragmentes wurde das DNA-Purifikationssystem QIAEX II verwendet.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- entsprechende Bande mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht-Kontrolle aus dem Gel herausschneiden
- Gelstück in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube abwiegen
- zu abgewogenem Volumen des Gelstückes dreifaches Volumen an QX1-Puffer hinzufügen
- QIAEX II-Lösung resuspendieren (30 sec vortexen)
- 30-60 µl QIAEX II-Lösung hinzufügen und vortexen
- 10 min bei 50°C im Wasserbad inkubieren und alle 2 min kurz vortexen
- 30 sec bei 13.100 rpm zentrifugieren, anschließend Überstand verwerfen
- 500 µl QX1-Puffer hinzufügen und vortexen
- 30 sec bei 13.100 rpm zentrifugieren, anschließend Überstand verwerfen
- 500 µl PE-Puffer hinzufügen und vortexen
- 30 sec bei 13.100 rpm zentrifugieren, anschließend Überstand verwerfen
- letzten Schritt 1 x wiederholen
- Pellet 10-15 min bei 37°C trocknen
- 20 µl Aqua bidest hinzufügen und vortexen
- 5 min bei RT stehen lassen
- 30 sec bei 13.100 rpm zentrifugieren
- DNA befindet sich im Überstand

### 3.4.1.1.6 Klonierung

- Vorbereitungen
  - LB-Medium ansetzen
  - LB-Agar-Medium ansetzen
  - LB-Agar-Platten herstellen:
    - LB-Agar-Medium im Schnellkochtopf 10 min kochen
    - 1-2 h bei 60°C im Wasserbad inkubieren
    - 30 µg/ml Tetrazyklin und 100 mg/ml Ampicillin hinzufügen und lösen
    - 30 ml Medium pro Platte gießen und erkalten lassen
    - Platten 10-15 min bei 37°C inkubieren

- 40 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) pro Platte auftragen und einziehen lassen
  - 40 µl IPTG (200 mg/ml in Aqua bidest) pro Platte auftragen und einziehen lassen
- Herstellung kompetenter Zellen
  - 2 ml LB-Medium in ein steriles Reagenzglas füllen
  - Eco XL1-Blue Bakterien mit einer sterilen Öse dazugeben
  - Bakterien über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubieren
  - zu 19,5 ml LB-Medium (vorgewärmt auf 37°C) 0,5 ml der über Nacht inkubierten Bakterienkultur hinzufügen und 1-2 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubieren
  - 30 min in Eiswasser inkubieren
  - 5 min bei 4°C und 6.300 x g zentrifugieren, anschließend Überstand verwerfen
  - Pellet mit 20 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mischen
  - 30-60 min auf Eis stellen und häufig mischen
  - 5 min bei 4°C und 6.300 x g zentrifugieren, anschließend Überstand verwerfen
  - Pellet in 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendieren
  - man erhält 2 ml kompetente Zellen
- Ligation von pGEM-T Vektor und Insert (PCR-Produkt)
  - Ansatz:
    - 5 µl 2 x Ligase-Puffer
    - 1 µl pGEM-T Vektor
    - 3 µl Insert
    - 1 µl DNA-Ligase (T4)
  - über Nacht bei 4°C im Wasserbad inkubieren
  - man erhält 10 µl Ligationsprodukt
- Transformation der kompetenten Zellen
  - 10 µl Ligationsprodukt mit 100 µl kompetenten Zellen mischen
  - 30 min auf Eis stehen lassen
  - 2 min bei 42°C im Wasserbad inkubieren
  - 2 min in Eiswasser inkubieren
  - 300 µl 37°C-warmes LB-Medium hinzufügen
  - 30 min bei 37°C inkubieren

- 150 µl transformierte Eco XL-1 Blue Bakterien auf LB-Agar-Platten mit einem Trigalski-Spatel verteilen
- über Nacht bei 37°C inkubieren
- Auswertung der LB-Agar-Platten
  - weiße Kolonien (durch die Insertion des Plasmids verlieren die Bakterienkolonien ihre blaue Farbe) mit einer sterilen Öse ernten
  - Bakterien in ein steriles Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium und 50 µl 1%igem Ampicillin geben
  - über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubieren

#### **3.4.1.1.7 Plasmid-Extraktion mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit**

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- 5 ml der über Nacht inkubierten Bakterien 2 min bei 4°C und 8.000 rpm zentrifugieren, anschließend Überstand verwerfen
- Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendieren
- 250 µl Puffer 2 hinzufügen und 3-6 x kippen
- 350 µl N3-Puffer hinzufügen und 3-6 x kippen
- 10 min bei 4°C und 18.000 rpm zentrifugieren
- Überstand (Plasmid) in Spin Column überführen und 1 min bei 4°C und 13.100 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 750 µl PE-Puffer auf Sieb pipettieren und 1 min bei 4°C und 13.100 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 1 min bei 4°C und 13.100 rpm zentrifugieren
- Spin Column auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube setzen
- 50 µl EB-Puffer auf Sieb pipettieren
- 1 min bei RT stehen lassen
- 1 min bei 4°C und 13.100 rpm zentrifugieren

Das Plasmid befand sich im Durchfluss. Mit einem BioPhotometer wurde die Konzentration des Plasmids bestimmt. Die nach der Klonierung erhaltenen Amplifikate wurden zur Überprüfung der Rezeptorsequenz sequenziert.

#### **3.4.1.1.8 Herausschneiden des ER $\alpha$ -Inserts aus dem Plasmid mit Hilfe von Not-I (antisense) und Nco-I (sense)**

- Spaltung des Plasmids mit Not-I und Nco-I (Doppolverdau)
  - Ansatz:
    - 0,2  $\mu$ l 100 x BSA-Lösung
    - 2  $\mu$ l Restriktionspuffer für Not-I und Nco-I (Puffer 3)
    - x  $\mu$ l Plasmid (mind. 100 ng)
    - 0,5  $\mu$ l Not-I
    - 0,5  $\mu$ l Nco-I
    - bis zu 20  $\mu$ l Aqua bidest
  - bei 37°C über Nacht im Wasserbad inkubieren
  - 20 min bei 65°C im Wasserbad inkubieren (Hitzeinaktivierung)
  - Nachweis des Transkriptes mittels 2%iger Agarose-Gelelektrophorese
- Spaltung des Plasmids mit Not-I und Nco-I (Einzelverdau)
  - Ansatz mit Not-I (antisense):
    - x  $\mu$ l Plasmid (mind. 100 ng)
    - 2  $\mu$ l Restriktionspuffer für Not-I (Puffer 3)
    - 0,2  $\mu$ l 100 x BSA-Lösung
    - 0,5  $\mu$ l Not-I
    - bis zu 20  $\mu$ l Aqua bidest
  - Ansatz mit Nco-I (sense):
    - x  $\mu$ l Plasmid (mind. 100 ng)
    - 2  $\mu$ l Restriktionspuffer für Nco-I (Puffer 4)
    - 0,5  $\mu$ l Nco-I
    - bis zu 20  $\mu$ l Aqua bidest
  - beide Ansätze bei 37°C über Nacht im Wasserbad inkubieren
  - 20 min bei 65°C im Wasserbad inkubieren (Hitzeinaktivierung)
- Herstellung der „sense“- und „anti-sense“-Sonden mittels in vitro-Transkription
  - Ansatz:
    - 8  $\mu$ l Aqua bidest
    - 4  $\mu$ l 5 x Transkriptionspuffer
    - 2  $\mu$ l 10 x Digoxigenin-RNA-Labeling-Mix
    - 2  $\mu$ l 100 x DTT

- x µl linearisiertes Plasmid (mind. 100 ng)
- 2 µl RNA-Polymerase (T7 für das Not-I geschnittene Plasmid, Sp6 für das Nco-I geschnittene Plasmid)
- 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- 0,5 µl 0,5 M EDTA-Lösung hinzufügen
- 1,2 µl 8 M Lithium-Chlorid-Lösung hinzufügen
- 70,7 µl gekühltes (-20°C) 100%iges Ethanol hinzufügen
- 1 h bei -80°C im Gefrierschrank inkubieren
- 20 min bei 4°C und 13.100 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 200 µl gekühltes (-20°C) 70%iges Ethanol hinzufügen
- 15 min bei 4°C und 13.100 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet bei 37°C trocknen
- 50 µl DEPC-Wasser hinzufügen
- 10 min bei 70°C im Wasserbad resuspendieren
- beide Sonden bei -20°C lagern

### 3.4.2 ISH ERα

- Herstellung der Gebrauchslösungen (DEPC-Wasser, 0,2 N HCl-Lösung, 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 1 x PBSM-Puffer, 0,2%ige Glyzin-Lösung, 20 x SSC-Stammlösung, 10 x TNMT-Puffer, 5 x NTB-Puffer, 20%ige Essigsäure, 3%iger BSA-Blockpuffer, 4%ige Paraformaldehyd-Lösung, Proteinase K-Stammlösung, 50%iges Dextransulfat, Denhardt-Reagenz (BFP), RNaseA-/RNaseT1-Stammlösung, 1 M Levamisol-Lösung, 20%iges Glycerol)
- Vorbereitung am Vortag
  - Paraffinschnitte in einem Objektträgerhalter und Xylol in einer geschlossenen Glasküvette bei 60°C über Nacht in den Wärmeschrank stellen

- 1. Tag
  - RNase-freien Arbeitsplatz und RNase-freie Arbeitsgeräte sicherstellen
  - Entparaffinierung und Rehydrierung
    - Schnitte bei 60°C im Wärmeschrank für 1 x 5 min in vorgewärmtem Xylol inkubieren
    - bei RT 2 x 5 min in Xylol inkubieren
    - 2 x 5 min in 100%igem Ethanol inkubieren
    - jeweils 5 min in 96%igem und in 70%igem Ethanol inkubieren
    - 5 min in DEPC-Wasser inkubieren
    - 20 min in 0,2 N HCl-Lösung inkubieren
    - 15 min in 70°C-warmem 2 x SSC-Puffer inkubieren
    - 5 min in PBSM-Puffer waschen
  - Demaskierung der Bindungsstellen mit Proteinase K
    - 12 min bei 37°C im Wärmeschrank in einer feuchten Kammer (mit DEPC-Wasser) mit Proteinase K (20 µg/ml) inkubieren
    - 5 min in 0,2%iger Glyzin-Lösung inkubieren
  - Blockierung der endogenen Phosphatase
    - 15-20 sec in 20%iger Essigsäure inkubieren
    - 5 min in PBSM-Puffer waschen
  - Nachfixierung
    - 10 min in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung nachfixieren
    - 5 min in PBSM-Puffer waschen
  - Prähybridisierung
    - 60 min in 20%igem Glycerol in DEPC-Wasser inkubieren
    - in 2 x SSC-Puffer abspülen
  - Hybridisierung
    - Sondengemisch und Hybridisierungspuffer herstellen
    - ca. 50 µl Sondengemisch auf die Schnitte pipettieren
    - 10-12 min auf eine 70°C-vorgeheizte Heizplatte legen und mit einer Metallplatte abdecken
    - 5 min auf einen Kühlakku legen
    - über Nacht bei 40°C in der Formamid-Kammer inkubieren



- 2. Tag
  - Posthybridisierung
    - Abspülen der Sonde mit 4 x SSC-Puffer (Not und Nco getrennt voneinander)
    - 4 x 15 min in 4 x SSC-Puffer waschen
    - 20 min in 2 x SSC-Puffer in 60°C-warmem Wasserbad inkubieren
    - 20 min in 0,2 x SSC-Puffer in 42°C-warmem Wasserbad inkubieren
    - 5 min in 0,1 x SSC-Puffer bei RT inkubieren
    - 5 min in 2 x SSC-Puffer bei RT inkubieren
  - Immunhistochemie
    - Antikörper-Lösung ansetzen: 999 µl 1 x TNMT-Puffer (+ Triton-X), 498 µl 3%igen BSA-Blockpuffer (in 1 x TNMT-Puffer) und 3 µl Anti-DIG-Fab-Antikörper miteinander vermischen
    - 10 min in 1 x TNMT-Puffer bei RT inkubieren
    - 1 h in 3%igem BSA-Blockpuffer bei RT inkubieren
    - Inkubation mit Anti-DIG-Fab-Antikörper in der feuchten Kammer über Nacht und bei 4°C
- 3. Tag
  - Antikörper auf ein Papiertuch abtropfen lassen
  - Schnitte 2 x 10 min in 1 x TNMT-Puffer inkubieren
  - 5 min in 1 x NTB-Puffer inkubieren (150 ml insgesamt = 30 ml 5 x NTB-Puffer + 120 ml Aqua bidest)
  - 5 min in 1 x NTB-Puffer + 250 µl 1 M Levamisol pro 50-70 ml Puffer inkubieren
  - Entwickeln mit NBT-BCIP-Lösung in der Dunkelkammer
  - 5 min in 1 x NTB-Puffer + 1 ml 1 M Levamisol (auf 299 ml Puffer) inkubieren
  - 2 x 5 min in Aqua bidest waschen
  - Eindecken in Glycergel

### 3.5 Nachweis der zellulären Lokalisation des ER $\alpha$ mittels Immunhistochemie (IHC)

Zum Nachweis des ER $\alpha$  wurde eine immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten von Patienten mit nsp unter Verwendung sechs verschiedener Primärantikörper durchgeführt (Tab. 4). An Paraffinschnitten von Patienten mit TIN wurde die immunhistochemische Färbung zum Nachweis des ER $\alpha$  mittels HC-20- und F-10-Antikörper durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Hodenpräparate, die Anschnitte von Ductuli efferentes aufwiesen, verwendet (Hess et al., 2011). Es wurde die ABC-Methode angewandt.

Es wurde nach folgendem immunhistochemischem Protokoll vorgegangen:

- Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte (siehe Kapitel 3.2.1.6)
- Spülen der Präparate in Aqua dest für 5 min und anschließend Spülen in frischem Waschpuffer (1 x Tris-HCl-Puffer)
- Hitzeinduzierte Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen in der Mikrowelle
  - Objektträger in Citratpuffer verbringen
  - Citratpuffer in Mikrowelle bei 800 Watt zum Kochen bringen und anschließend für 15 min bei 465 Watt kochen
  - Schnitte abkühlen lassen und für 2 x 5 min in Waschpuffer waschen
- Blockierung endogener Enzymaktivitäten (endogene Peroxidase)
  - Inkubation der Schnitte in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung für 30 min bei RT
  - Spülen in Aqua dest für 5 min
  - Waschung in Waschpuffer für 3 x 5 min
- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
  - 30-minütige Inkubation in 5%igem BSA in der feuchten Kammer bei RT
- Inkubation mit Primärantikörpern (Tab. 4):
  - Verdünnung des jeweiligen Antikörpers in 5%igem BSA
  - Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer
  - Waschung mit Waschpuffer für 3 x 5 min

**Tab. 4:** Primärantikörper IHC ER $\alpha$ .

Abkürzung	Beschreibung	Verdünnung
HC-20	polyklonal aus dem Kaninchen; gegen die AS 545-595 des C-terminalen Endes des humanen ER $\alpha$ gerichtet	1:100
F-10	monoklonal aus der Maus; gegen die AS 570-595 des C-terminalen Endes des humanen ER $\alpha$ gerichtet	1:50
H-184	polyklonal aus dem Kaninchen; gegen die AS 1-185 des N-terminalen Endes des humanen ER $\alpha$ gerichtet	1:100
1F3	monoklonal aus der Maus; gegen die AS 1-190 des N-terminalen Endes des humanen ER $\alpha$ gerichtet	1:100
1D5	monoklonal aus der Maus; gegen das N-terminale Ende des humanen ER $\alpha$ gerichtet	1:50
60C	monoklonal aus dem Kaninchen; gegen das N-terminale Ende des humanen ER $\alpha$ gerichtet	1:50

- Inkubation mit Sekundärantikörpern (Tab. 5):
  - Verdünnung der Antikörper in 5%igem BSA
  - Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 60 min bei RT in der feuchten Kammer
  - Waschung mit Waschpuffer für 3 x 5 min

**Tab. 5:** Sekundärantikörper IHC ER $\alpha$ .

Abkürzung PAK	Beschreibung	Verdünnung
HC-20	Nr. E0432, Ziege-anti-Kaninchen, biotiniliert	1:300
F-10	Nr. E0433, Ziege-anti-Maus, biotiniliert	1:300
H-184	Nr. E0432, Ziege-anti-Kaninchen, biotiniliert	1:300
1F3	Nr. E0433, Ziege-anti-Maus, biotiniliert	1:300
1D5	Nr. E0433, Ziege-anti-Maus, biotiniliert	1:300
60C	Nr. E0432, Ziege-anti-Kaninchen, biotiniliert	1:300

- Inkubation mit Vector Vectastain ABC-Elite Kit Standard für 60 min bei RT in der feuchten Kammer, anschließend Waschung mit Waschpuffer für 3 x 5 min
- Färbung mit AEC
  - Farbstoff maximal 30 min einwirken lassen
  - die Schnitte nach ca. 10 min bei 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop beurteilen
  - OT mit Aqua dest abspülen und für 3 x 5 min in Aqua dest wässern
- Schnitte mit Glyceringelatine eindecken

Jede Immunhistochemie schloß eine Negativkontrolle ein, die wie oben beschrieben behandelt wurde. Die Inkubation mit den Primärantikörpern wurde dabei durch eine Inkubation mit Blockpuffer ersetzt. Zusätzlich wurde zur Überprüfung der Spezifität der eingesetzten Antikörper an einem weiteren Schnitt eine kompetitive Hemmung mit Blockingpeptiden durchgeführt (für den HC-20-, den F-10- und den 60C-Antikörper). Hierbei wurde das Blockingpeptid in einer Verdünnung von 1:20 (HC-20-Antikörper) und 1:10 (F-10- und 60C-Antikörper) eingesetzt. Das Antikörper-Blockingpeptid-Gemisch wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Gemisch ebenso eingesetzt wie die Primärantikörperlösung.

Die Auswertung der Immunreaktion und die Anfertigung der Abbildungen für den Ergebnisteil erfolgten mit Hilfe des Photolichtmikroskops Axiophot. Hierbei wurden das Plan-Apochromat- (x20) und das Plan-Neofluar-Objektiv (x40) verwendet.

### **3.6 Verifizierung der zytoplasmatischen ER $\alpha$ -Lokalisation mittels RT-PCR**

Schnitte, die sowohl nsp, als auch TIN aufwiesen, wurden nach RNA-Extraktion einer RT-PCR für ER $\alpha$  unterzogen.

Die Entparaffinierung, Hämatoxylinfärbung und Rehydrierung erfolgte unter RNase-freien Bedingungen. Anschließend wurde die Hälfte eines jeden Schnittes, die TIN aufwies, vorsichtig mit einem sterilen Skalpell vom Objektträger entfernt und in ein steriles Eppendorf-Tube überführt. Mit der anderen Hälfte des Schnittes, die Keimtubuli mit nsp aufwies, wurde ebenso verfahren.

### **3.6.1 RNA-Extraktion aus Paraffingewebe mit dem RNeasy FFPE Kit (Cat.No. 74404)**

Zur Vorbereitung des Kits wurde die vierfache Menge an 96-100%igem Ethanol zur RPE-Puffer-Stammlösung hinzugefügt.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- zu Paraffinschnitten in Schraubdeckeltube 1 ml Xylol p.a. hinzufügen und für 10 sec kräftig vortexen
- für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugieren

Das Ergebnis waren ein Pellet und flüssiger Überstand.

- Überstand vorsichtig abpipettieren
- zum Pellet Zugabe von 1 ml 100%igem Ethanol p.a. und durch Vortexen mischen
- für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abpipettieren, kurz herunterzentrifugieren und gesammelten Rest nochmals abpipettieren
- Pellet in geöffnetem Tube bei einer Temperatur von 37°C 10 min trocknen lassen
- zum Pellet 240 µl PKD-Puffer (RNeasy FFPE-Kit) und 10 µl Proteinase K (RNeasy FFPE-Kit) hinzufügen und durch Vortexen mischen
- für 18 h im 55°C warmen Wasserbad inkubieren
- für 15 min im 80°C warmen Wasserbad inkubieren
- Zugabe von 500 µl RBC-Puffer (RNeasy FFPE-Kit)
- Zugabe von 1200 µl 100%igem Ethanol p.a.
- Überführen von 700 µl in Säule
- für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren
- Verwerfen des Durchflusses und Wiederholung der letzten beiden Schritte, bis alles durch die Säule gefiltert wurde
- Zugabe von 500 µl RPE-Puffer (RNeasy FFPE-Kit) und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 sec
- Verwerfen des Filtrates
- Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 2 min
- Verwerfen des Filtrates und des Eppendorf-Tubes

- Umsetzen in ein neues 2 ml Eppendorf-Tube und Zentrifugation der offenen Säule bei 14.000 rpm für 5 min
- Verwerfen des Filtrates und des Eppendorf-Tubes
- Umsetzen in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube, Zugabe von 14 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 min
- RNA in ein RNase-freies Schraubdeckeltube geben

### 3.6.2 RNA-Messung

Die Messung der extrahierten RNA erfolgte mittels Absorptions-Einstrahlphotometrie unter Verwendung eines BioPhotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei wurde auf Grundlage der optischen Dichte ( $OD_{260nm} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$ ) aus der gemessenen Extinktion der Lösung ( $E_{260nm}$ ) die RNA-Konzentration bestimmt. Die Reinheit der RNA-Lösung ergab sich aus dem Quotient zweier Messungen ( $E_{260nm}/E_{280nm}$ ) und sollte zwischen 1,65 und 2,00 liegen.

Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 69 µl Tris-HCl-Puffer in eine Kunststoff-Einmalküvette einfüllen und Leerwert messen
- 1 µl RNA hinzufügen, gut vermischen und RNA-Menge messen
- übrige RNA bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C lagern

### 3.6.3 RT-PCR

Die RT-PCR mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese wurde bereits in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

### **3.7 Charakterisierung immunopositiver interstitieller Zellen nach ER $\alpha$ -IHC (HC-20) und UV-LAM mittels RT-Nested-PCR**

#### **3.7.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinschnitte) für die IHC**

Im Kapitel 3.2.1 wurde die Herstellung von Paraffinschnitten für die IHC bereits beschrieben. Das Aufnehmen zweier aufeinander folgender Paraffinschnitte erfolgte auf mit einer Membran überzogenen Objektträger (P.A.L.M Membran Slide), welche speziell für die Technik der UV-LAM benötigt wurden. Die OT wurden zuvor unter der Sterilbank für 30 min mit UV-Licht (Wellenlänge: 254 nm) bestrahlt, um eine bessere Anhaftung des Gewebes zu gewährleisten.

#### **3.7.2 IHC ER $\alpha$**

Die IHC (HC-20-Antikörper) zum Nachweis des ER $\alpha$  auf Proteinebene wurde bereits in Kapitel 3.5 beschrieben.

Das oben beschriebene Protokoll erfolgte mit folgenden Abweichungen:

- Arbeiten unter RNase-freien Bedingungen
- keine hitzeinduzierte Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen in der Mikrowelle
- Verkürzung der Inkubationszeit mit primärem Antikörper (HC-20) in einer Verdünnung von 1:100 auf 3 h bei RT
- die Schnitte wurden im Anschluß an die Färbung nicht mit Glyceringelatine eingedeckt, sondern gleich der UV-LAM unterzogen

#### **3.7.3 UV-LAM**

Die Arbeitsschritte der Mikrodissektion wurden bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

### **3.7.4 RNA-Extraktion aus mikrodisektiertem Gewebe mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Cat.No. 74134)**

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- gepickte Zellen mit RLT-Puffer lysieren
- Zelllysate durch 5-maliges Aufziehen mit einer sterilen Spritze homogenisieren
- gDNA Eliminator-Säule auf ein 2 ml Eppendorf-Tube setzen
- Zellhomogenat auf die Säule pipettieren
- 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren, Säule verwerfen
- zum Durchfluss 70%iges Ethanol hinzufügen und gut mischen
- entstandenes Präzipitat in RNeasy spin column überführen
- 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 700 µl RW1-Puffer hinzufügen
- 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 500 µl RPE-Puffer hinzufügen
- 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 500 µl RPE-Puffer hinzufügen
- 2 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 1 min bei maximaler Zentrifugenleistung zentrifugieren
- Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf-Tube umsetzen
- 30-50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran der Säule pipettieren
- 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren
- anschließend RNA-Messung siehe Kapitel 3.6.2

### **3.7.5 Reverse Transkription**

Die RT wurde bereits in Kapitel 3.3.3.2 beschrieben.



### 3.7.6 Nested-PCR

Die Nested-PCR ist eine verschachtelte PCR in zwei Schritten. Sie findet Anwendung bei sehr geringen Mengen der zu amplifizierenden DNA. In der ersten PCR wird der gewünschte Abschnitt der DNA synthetisiert und in der zweiten PCR dient dieser Abschnitt als Vorlage.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- PCR-Mix herstellen: 10 µl 5 x Go Taq-Buffer, 5 µl 2 mM dNTPs, 1 µl Vorwärts-Primer (50 pmol/µl), 1 µl Rückwärts-Primer (50 pmol/µl), 31,75 µl DEPC-Wasser, 0,25 µl Go Taq-Polymerase
- 49 µl PCR-Mix mit 1 µl cDNA mischen
- im Thermocycler wurde folgendes Programm durchlaufen:
  - Schritt 1: 2 min bei 95°C inkubieren
  - Schritt 2: 1 min bei 95°C inkubieren
  - Schritt 3: 30 sec bei X°C inkubieren
  - Schritt 4: 1 min bei 72°C inkubieren
  - Schritt 2-4 35 x wiederholen
  - Schritt 5: 5 min bei 72°C
- Primerpaare:

Alle Primerpaare wurden von der Firma MWG Biotech GmbH, Ebersberg synthetisiert. Die Schmelztemperatur der Primer lag bei 60°C.

Die Primersequenzen sind in Tab. 6 aufgelistet.

**Tab. 6:** Primersequenzen Nested-PCR ER $\alpha$  und StAR.

Name	Primersequenz	NCBI Accession Number	Produktlänge
ER $\alpha$	for 5' - TGGAGATCTTCGACATGCTG - 3' rev 5' - TCCAGAGACTTCAGGGTGCT - 3'	NM_000166	145 bp
ER $\alpha$ nested	for 5' - CTGGCTACATCATCTCGGT - 3' rev 5' - GGACAGAAATGTGTACACT - 3'	NM_000166	105 bp
StAR	for 5' - ACGTGGATTAACCAGGTTCG - 3' rev 5' - CAGCCCTCTTGGTTGCTAAG - 3'	NM_000349	149 bp
StAR nested	for 5' - GCGGCGGAGCTCTCTACTC - 3' for 5' - GATGCCAAGGCCTTCTG - 3'	NM_000349	109 bp

Im Anschluß erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese, die bereits in Kapitel 3.3.3.4 beschrieben wurde.

### 3.8 Nachweis der ER $\alpha$ -Expression auf Proteinebene mittels Immunoblot Analyse (IB)

#### 3.8.1 Extraktion und Isolation der Proteine

Für die Extraktion und Isolation von Proteinen wurde Gefriermaterial verwendet, welches unmittelbar nach operativer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde. Hierbei handelte es sich um Hodenbiopsien von Patienten mit normaler Spermatogenese. MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7)- und T47D-Zellen dienten als Positivkontrolle.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- 70 - 80 mg Hodengewebe abwiegen bzw. MCF-7- und T47D-Zellen ablösen und waschen
- Gewebe bzw. Zellen in ein Eppendorf-Tube mit 500  $\mu$ l RIPA-Puffer und einem Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, P8340) überführen und anschließend homogenisieren

- Zelllysate 10 Minuten bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 11.400 rpm zentrifugieren

Im gewonnenen Überstand wurde das darin enthaltene Protein mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976) bestimmt.

### **3.8.2 IB E $\alpha$**

#### **3.8.2.1 Probenvorbereitung**

- 65 µg Protein enthaltene Proben mit 3x SDS Sample Buffer mischen
- Probengemische vortexen und kurz anzentrifugieren
- Probengemische 10 min bei 95°C im Wasserbad inkubieren

#### **3.8.2.2 Gelelektrophorese und Elektroblothing**

- 10 %iges SDS Polyacrylamidgel in Elektrophoresekammer arretieren
- Proteinmarker und Probengemische auf den Taschenboden des Gels pipettieren
- Laufpuffer in die Innen- und Außenkammer füllen
- Deckel auf die Kammer setzen und Elektroden mit Stromgeber verbinden
- Gel bei 200 Volt für 60 min laufen lassen
- Blotting-Pads, eine Nitrozellulosemembran und zwei Filterpapiere in einer Inkubationsschale in Transferpuffer einweichen
- Gel sofort nach Beendigung der Gelelektrophorese weiterverarbeiten
- Gel mit Aqua dest abspülen und aus Gelkassette herauslösen
- Kathode des Blotmoduls wie folgt befüllen (von oben nach unten):
  - 2 Blotting Pads
  - Filterpapier
  - Nitrozellulosemembran
  - Gel
  - Filterpapier
  - 3 Blotting Pads
- obere Elektrodenplatte (Anode) aufsetzen
- vollständiges Blotmodul in der Blotting Kammer arretieren

- Blotmodul und äußere Kammer mit Transferpuffer bzw. Aqua bidest befüllen
- Blotmodul bei 30 Volt für 60 min laufen lassen

### 3.8.2.3 Immunbestimmung

Zur Immunbestimmung wurden die in Tab. 4 genannten Antikörper verwendet. Alle sechs getesteten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden Ziege-anti-Kaninchen- oder Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Schaf-anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet.

- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
  - Blockpuffer I ansetzen
  - lichtgeschützte Inkubation der Nitrozellulosemembran für 30 min bei RT auf dem Wipptisch
  - Blockpuffer I entfernen
- Inkubation mit Primärantikörpern
  - Waschpuffer herstellen
  - Primärantikörper-Lösungen herstellen
  - Primärantikörper-Lösungen auf die Membran geben und über Nacht bei 4°C inkubieren
  - Primärantikörper-Lösungen entfernen
  - Membran 3 x 5 min waschen
- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
  - Blockpuffer II (5%iges Ziegenserum) herstellen
  - Glasküvette mit Blockpuffer II befüllen und 30 min bei RT auf dem Wipptisch inkubieren
  - Blockpuffer II entfernen
- Inkubation mit Sekundärantikörpern
  - Sekundärantikörper-Lösungen herstellen
  - Sekundärantikörper-Lösungen auf die Membran geben und 45 min bei RT auf dem Wipptisch inkubieren
  - Sekundärantikörper-Lösungen entfernen
  - Membran 4 x 5 min mit 0,1 M PBS-Puffer mit 0,1%igem Tween-20 waschen

- Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels SuperSignal West Femto Chemilumineszenz-Substrat.

Jede Proteinnachweisreaktion schloss eine Negativkontrolle ein, die wie oben beschrieben behandelt wurde. Dabei wurde die Primärantikörperlösung mit Blockingpeptiden (200 µg/ml, Verdünnung 1:80) versetzt (HC-20, F-10 und 60C) oder die Inkubation mit der Primärantikörperlösung fehlte (H-184, 1F3 und 1D5).

### **3.9 Nachweis der ER $\alpha$ -, ER $\beta$ - und GPER-Expression mittels quantitativer RT-PCR (RT-qPCR)**

Mittels RT-qPCR wurde die ER $\alpha$ -, ER $\beta$ - und GPER-Expression bei Patienten mit unterschiedlichen histologischen Diagnosen ermittelt. Hierfür wurden jeweils 5 monomorphe Biopsien mit nsp, sda (nur für ER $\alpha$ ), sza, sga und sco verwendet.

#### **3.9.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate (Paraffinschnitte) für die Extraktion von RNA aus Paraffinmaterial**

Die Herstellung histologischer Schnittpräparate erfolgte wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Zehn 5 µm dicke Schnitte wurden mittels Schlittenmikrotom (Leica SM 2000 R) unter RNase-freien Bedingungen angefertigt und in ein RNase-freies 2 ml Schraubdeckel-Tube verbracht.

#### **3.9.2 RNA-Extraktion aus Paraffingewebe mit dem RNeasy FFPE Kit (Cat.No. 74404)**

Die RNA-Extraktion wurde bereits in Kapitel 3.6.1 beschrieben.

#### **3.9.3 Einstellung der RNA**

Nach der photometrischen Messung der RNA wurden die Arbeitslösungen auf eine feste RNA-Menge von 100 ng/µl sterilem Aqua bidest eingestellt.

Hierfür wurde folgende Formel angewendet:

- $100 \text{ ng} \times 10 \text{ } \mu\text{l Aqua bidest} = \text{gemessene RNA in ng} \times X \text{ } \mu\text{l RNA-Lösung}$
- $\Rightarrow 1000 \text{ ng/} \mu\text{l} : \text{gemessene RNA in ng/} \mu\text{l} = X \text{ } \mu\text{l RNA-Lösung}$
- $10 \text{ } \mu\text{l} - X \text{ } \mu\text{l RNA-Lösung} = Y \text{ } \mu\text{l Aqua bidest}$

X ist die Menge an RNA-Lösung, die gebraucht wird.

Y ist die Menge, die an Aqua bidest zur Probe hinzugefügt werden muss.

Bei einer gemessenen RNA-Menge von 349,6 ng ergibt sich folgende Rechnung:

- $1000 \text{ ng/} \mu\text{l} : 349,6 \text{ ng/} \mu\text{l} = 2,86 \text{ } \mu\text{l RNA-Lösung}$
- $10 \text{ } \mu\text{l} - 2,86 \text{ } \mu\text{l RNA-Lösung} = 7,14 \text{ } \mu\text{l Aqua bidest}$
- Kontrolle:  $2,86 \text{ } \mu\text{l RNA-Lösung} \times 349,6 \text{ ng/} \mu\text{l gemessene RNA} = 999,86 \text{ ng}$
- $\Rightarrow 999,86 \text{ ng} : 10 \text{ } \mu\text{l} = 99,99 \text{ ng/} \mu\text{l RNA}$

Anschließend wurde die eingestellte RNA bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 3.9.4 RT-PCR

Die RT-PCR erfolgte wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Es wurden die auf 100 ng/ $\mu$ l Aqua bidest eingestellten RNA-Arbeitslösungen in cDNA umgeschrieben. In der anschließenden PCR mit Agarosegel-Elektrophorese wurden Primer für ER $\alpha$ , GPER, ER $\beta$ ,  $\beta$ -Aktin und GAPDH auf die Verwendbarkeit in der RT-qPCR getestet. Nur Primer, die eine einzelne, spezifische Bande produzierten, waren zunächst für die RT-qPCR geeignet.

### 3.9.5 qPCR

#### 3.9.5.1 cDNA-Verdünnungsreihe

Primer, die laut PCR und Agarosegel-Elektrophorese für die RT-qPCR geeignet waren, wurden in einer cDNA-Verdünnungsreihe getestet. Dabei sollte die Schmelzkurve die Spezifität der Amplifikation nachweisen und aus der Standardkurve konnte die Effizienz der Amplifikation ermittelt werden. Als Referenzgene wurden  $\beta$ -Aktin und GAPDH verwendet.  $\beta$ -Aktin und GAPDH sind in ihrer Expression unabhängig von der histologischen Diagnose.

Die Primer sind in Tab. 7 aufgelistet.

**Tab. 7:** Primersequenzen RT-qPCR  $\beta$ -Aktin, GAPDH, ER $\alpha$ , ER $\beta$  und GPER.

Name	Primersequenz	NCBI Accession Number	Produktlänge
$\beta$ -Aktin	for 5' - TTCCTTCTTGGGCATGGAGT - 3' rev 5' - TACAGGTCTTTGCGGATGTC - 3'	NM_001101.3	90 bp
GAPDH	for 5' - CCAGGTGGTCTCCTCTGACTT - 3' rev 5' - GTGGTCGTTGAGGGCAATG - 3'	NM_002046	81 bp
ER $\alpha$	for 5' - GGAGGGCAGGGGTGAA - 3' rev 5' - GGCCAGGCTGTTCTTCTTAG - 3'	NM_000125	102 bp
ER $\beta$	for 5' - AGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAG - 3' rev 5' - GACAGCGCAGAAGTGAGCATC - 3'	NM_001040275	142 bp
GPER	for 5' - CGTCCTGTGCACCTTCATGT - 3' rev 5' - AGCTCATCCAGGTGAGGAAGAA - 3'	NM_001505.2	76 bp

Pro Primerpaar wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Herstellung des Primer-Mixes pro Probe:
  - 10  $\mu\text{l}$  IQ<sup>TM</sup> Sybr Green Supermix
  - 0,6  $\mu\text{l}$  Vorwärts-Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
  - 0,6  $\mu\text{l}$  Rückwärts-Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
  - 6,8  $\mu\text{l}$  steriles Aqua bidest
- Herstellung der cDNA-Verdünnungsreihe:

Für die Verdünnungsreihe wurde cDNA von einem Patienten mit normaler Spermatogenese verwendet.

  - Tube 1: 7  $\mu\text{l}$  unverdünnte cDNA
  - Tube 2: 1  $\mu\text{l}$  unverdünnte cDNA + 9  $\mu\text{l}$  steriles Aqua bidest mischen => Verdünnung 1:10
  - Tube 3: 1  $\mu\text{l}$  cDNA (Verdünnung 1:10) + 9  $\mu\text{l}$  steriles Aqua bidest mischen => Verdünnung 1:100
  - Tube 4: 1  $\mu\text{l}$  cDNA (Verdünnung 1:100) + 9  $\mu\text{l}$  steriles Aqua bidest mischen => Verdünnung 1:1000
  - Tube 5: 1  $\mu\text{l}$  cDNA (Verdünnung 1:1000) + 9  $\mu\text{l}$  steriles Aqua bidest mischen => Verdünnung 1:10.000
- Plattenbelegung pro Primerpaar (siehe Tab. 8):
  - in drei aufeinanderfolgenden Wells jeweils 2  $\mu\text{l}$  cDNA der gleichen Konzentration pipettieren
  - in drei Wells 2  $\mu\text{l}$  steriles Aqua bidest (No Template Control = NTC) pipettieren
  - pro Well 18  $\mu\text{l}$  Primer-Mix des entsprechenden Primers pipettieren
  - Ansatz vorsichtig durch Aufziehen mit der Pipettenspitze mischen
  - Platte mit einer Klebefolie verschließen und in den Thermocycler stellen



**Tab. 8:** Platten-Belegungsschema cDNA-Verdünnungsreihe RT-qPCR.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>A</b>	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt
<b>B</b>	1:10	1:10	1:10
<b>C</b>	1:100	1:100	1:100
<b>D</b>	1:1000	1:1000	1:1000
<b>E</b>	1:10000	1:10000	1:10000
<b>F</b>	NTC	NTC	NTC

- im CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System wurde folgendes Programm durchlaufen:
  - Schritt 1: 3 min bei 95°C inkubieren
  - Schritt 2: 10 sec bei 95°C inkubieren
  - Schritt 3: 1 min bei 60°C inkubieren
  - Detektion von Fluoreszenz
  - Schritt 2-3 39 x wiederholen
  - Schritt 4: 10 sec bei 95°C inkubieren
  - Schritt 5: Schmelzkurvenerstellung von 65°C bis 95°C mit einer schrittweisen Erhöhung um 0,5°C je 5 sec
  - Detektion von Fluoreszenz

Die Auswertung der cDNA-Verdünnungsreihe erfolgte mit Hilfe der CFX<sup>TM</sup> Manager Software. Für den eigentlichen Genexpressionsvergleich unterschiedlicher Hodenbiopsien wurden Primerpaare verwendet, die:

- eine einzelne, spezifische Bande nach der RT-PCR und anschließender Agarosegel-Elektrophorese zeigten (anschließend erfolgte eine Sequenzierung des jeweiligen Produktes)
- eine einzelne, spezifische Schmelzkurve produzierten (um auszuschließen, dass die Fluoreszenzsignale von anderen Fragmenten stammen (z.B. Primerdimer, Verunreinigungen))
- eine aus der Steigung der Standardkurve errechnete Effizienz zwischen 80 und 120% aufwiesen

### **3.9.5.2 Genexpressionsvergleich unterschiedlicher Hodenbiopsien**

Die Primerpaare, der Ansatz des Primer-Mixes pro Probe, die Plattenbelegung sowie das Cyclex-Programm entsprachen den oben genannten Ausführungen der cDNA-Verdünnungsreihe. Für jeden Patienten mit jeweils einer Diagnose (nsp, sda (nur für ER $\alpha$ ), sza, sga oder sco) wurde erneut ein dreifacher Ansatz gewählt, der auch eine Negativkontrolle mit sterilem Aqua bidest beinhaltete (Tab. 9). Pro Platte wurde immer ein Patient mit nsp als Referenz verwendet.

**Tab. 9:** Platten-Belegungsschema Genexpressionsvergleich qPCR.

Pat = Patient, NTC = No Template Control (Wasserleerprobe).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>A</b>	β-Aktin	β-Aktin	β-Aktin	GAPDH	GAPDH	GAPDH	ERα	ERα	ERα
	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp	nsp
	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1
<b>B</b>	β-Aktin	β-Aktin	β-Aktin	GAPDH	GAPDH	GAPDH	ERα	ERα	ERα
	sco	sco	sco	sco	sco	sco	sco	sco	sco
	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1	Pat 1
<b>C</b>	β-Aktin	β-Aktin	β-Aktin	GAPDH	GAPDH	GAPDH	ERα	ERα	ERα
	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

Die Auswertung der cDNA-Verdünnungsreihe erfolgte mit Hilfe der CFX<sup>TM</sup> Manager Software unter Nutzung der  $\Delta\Delta C(t)$  Methode.

### 3.9.5.3 Statistische Verfahren

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde die Normalverteilung der Daten ermittelt. Mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA und anschließendem Tukey-Test wurde die Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Diagnosen ermittelt.

## 3.10 Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 mittels IHC

Es wurden Biopsien von Patienten mit nsp, hyp, sda, sza sowie Schnitte mit bunter Atrophie verwendet. Es wurde die indirekte APAAP-Methode verwendet und für den Sekundäntikörper sowie für den APAAP-Komplex eine Doppelinkubation vorgenommen. Das hierfür verwendete Protokoll entspricht dem unter Kapitel 3.5 aufgeführten Protokoll mit folgenden Änderungen:

- Inkubation mit Primärantikörper (Tab. 10):
  - Verdünnung des Antikörpers in 5%igem BSA
  - Inkubation mit dem Primärantikörper für eine Stunde bei RT in der feuchten Kammer
  - Waschung mit Waschpuffer für 3 x 5 min

**Tab. 10:** Primär- und Sekundärantikörper sowie Detektionssystem IHC Ki-67.

Abkürzung	Beschreibung	Verdünnung
PAK	monoklonal aus der Maus; Nr. M7240	1:100
SAK	Kaninchen-anti-Maus, Nr. E0464	1:50
APAAP	Maus-Enzymkomplex, Nr. K5000	1:100

- 1. Inkubation mit Sekundärantikörper (siehe Tab. 10):
  - Verdünnung des Antikörpers in 5%igem BSA
  - Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei RT in der feuchten Kammer
  - Waschung mit Waschpuffer für 3 x 5 min
- 1. Inkubation mit APAAP-Komplex:
  - Verdünnung des APAAP-Enzymkomplexes in 5%igem BSA
  - Inkubation mit APAAP für 30 min bei RT in der feuchten Kammer
  - Waschung mit Waschpuffer für 3 x 5 min
- 2. Inkubation mit Sekundärantikörper:
  - Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 10 min bei RT in der feuchten Kammer
  - Waschung mit Waschpuffer für 3 x 5 min
- 2. Inkubation mit APAAP:
  - Inkubation mit APAAP für 10 min bei RT in der feuchten Kammer
  - Waschung mit Waschpuffer für 3 x 5 min
- Färbung mit Fuchsin
  - Farbstoff maximal 20 min einwirken lassen
  - vorläufiges Färbeergebnis nach ca. 10 min bei 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop beurteilen
  - OT mit Aqua dest abspülen und für 3 x 5 min in Aqua dest wässern

- Gegenfärbung mit Hämatoxylin
  - jeweils 1-2 Tropfen Hämatoxylin (Aqua dest : Hämatoxylin im Verhältnis 1:1) auf die Schnitte geben und ca. 5 sec einwirken lassen
  - anschließend Farbkontrolle unter dem Mikroskop und in Leitungswasser wässern
  - danach mit Aqua dest spülen
- Schnitte in Glycingelatine eindecken

Jede Immunhistochemie schloss eine Negativkontrolle ein, die wie oben beschrieben behandelt wurde. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde allerdings durch eine Inkubation mit Blockpuffer ersetzt. Es wurde keine Blockierung endogener Enzymaktivitäten (endogene Peroxidase) vorgenommen.

### **3.11 Bestimmung des peripheren Östrogenwertes**

Patienten des Kollektivs wurde unter standardisierten Bedingungen venöses Blut entnommen. Die Entnahme erfolgte zwischen 8 Uhr und 12 Uhr. Das Blut wurde anschließend zentrifugiert und sofort bei -20°C gelagert. Die Bestimmung des 17 $\beta$ -Östradiolwertes erfolgte mittels Immunofluoreszenz-Photometrie (AutoDELFIA automatic immunoassay system) aus Serumproben (Zitzmann et al., 2006). DELFIA steht für Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay und entspricht in seiner Funktion einem ELISA. Es kommt das zu den Lanthanoiden gehörende Europium zum Einsatz, welches bei einer Wellenlänge zwischen 613 und 618 nm mit roter Farbe fluoresziert. Die Vorteile eines DELFIA gegenüber einem ELISA sind seine höhere Sensitivität (Messungen sind im Bereich von 1 - 10000 pg/ml möglich), sein geringerer Probeneinsatz und seine längere Signalstabilität (Talvitie, 2006).

### **3.12 Histomorphometrische Analyse an Ki-67-gefärbten Paraffinschnitten und Korrelation mit dem peripheren Östrogenwert**

Die Evaluation der Ki-67-gefärbten Paraffinschnitte wurde mittels Leica DMLB Mikroskop vorgenommen. Hierbei wurde eine 400-fache Vergrößerung gewählt. Es wurden insgesamt 27 Biopsien von 24 Patienten ausgewertet. Für jeden Tubulus einer jeden Biopsie wurde die Anzahl immunopositiver und immunonegativer Spermatogonien ermittelt. Das Verhältnis Ki-67-gefärbter Zellen pro Gesamtzahl an Spermatogonien ergab den Prozentsatz proliferierender Spermatogonien. Pro Tubulus seminiferus contortus wurde zusätzlich die

jeweilige histologische Diagnose gestellt. Mittels Shapiro-Wilk-Test wurde die Normalverteilung der Daten geprüft. Der gemittelte Prozentsatz immunopositiver Spermatogonien pro Biopsie wurde mit dem jeweiligen peripheren Östrogenwert des entsprechenden Patienten in einen Zusammenhang gebracht (Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson). Mittels Mann-Whitney-Test wurden die signifikanten Unterschiede zwischen insgesamt ausgewerteten Tubuli mit unterschiedlichen Diagnosen ermittelt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 RT-PCR ER $\alpha$ nach UV-LAM**

Zur Unterscheidung von intratubulärer und/oder interstitieller ER $\alpha$ -mRNA-Expression wurden Keimtubuli und Interstitium mit nsp oder sco mit Hilfe der UV-LAM getrennt voneinander isoliert. Das mikrodisektierte Gewebe wurde auf seinen mRNA-Gehalt untersucht sowie zunächst einer RT-PCR für den Nachweis des Referenzgens  $\beta$ -Aktin unterzogen. Anschließend erfolgte die RT-PCR mit ER $\alpha$ -Primern. Ein Ansatz mit sterilem Aqua bidest diente als methodische Negativkontrolle.

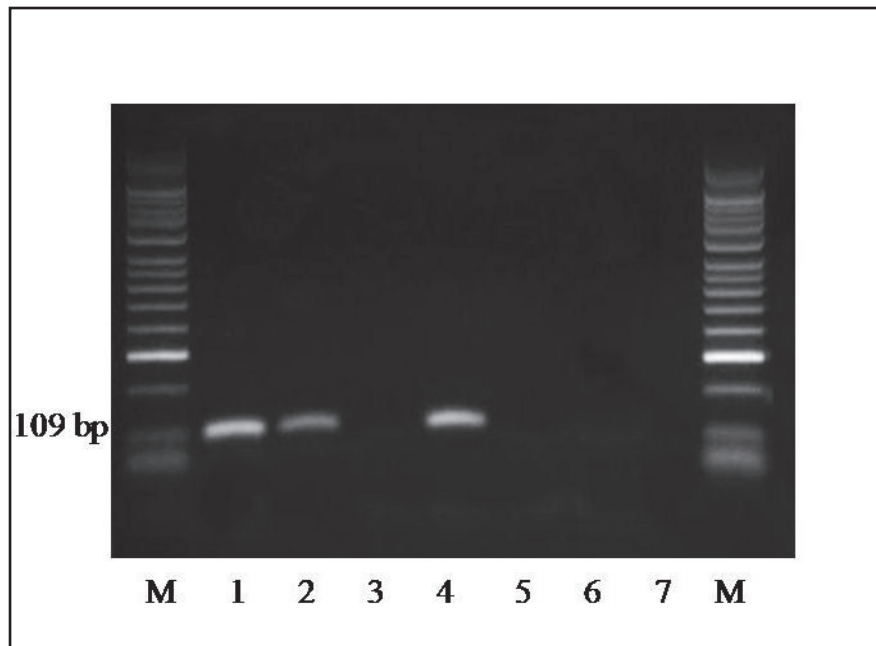
Als Proben dienten jeweils drei Biopsien von Patienten mit nsp oder sco. Außerdem sollte der Rezeptor in Hodenhomogenat von Patienten mit nsp und sco nachgewiesen werden.

#### **4.1.1 Normale Spermatogenese**

Mittels RT-PCR für  $\beta$ -Aktin konnte in allen untersuchten Proben mit nsp ein spezifisches Produkt von 90 bp nachgewiesen werden. Die RT-PCR für ER $\alpha$  zeigte in Hodenhomogenat von Patienten mit nsp sowie in gepickten Keimtubuli mit nsp ein spezifisches Produkt von 102 bp (Abb. 6, Spur 1 und 2). Im Interstitium (Abb. 6, Spur 3) sowie in der Wasserleerprobe (Abb. 6, Spur 7) konnte keine ER $\alpha$ -mRNA-Expression belegt werden.

#### **4.1.2 Sertoli cell only-Syndrom**

Die RT-PCR für  $\beta$ -Aktin zeigte in allen untersuchten Proben mit sco ein spezifisches Produkt von 90 bp. Die RT-PCR für ER $\alpha$  zeigte in Hodenhomogenat von Patienten mit sco ein spezifisches Produkt von 102 bp (Abb. 6, Spur 4). In den gepickten Proben mit Tubuli oder Interstitium konnte keine ER $\alpha$ -mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 6, Spur 5 und 6).



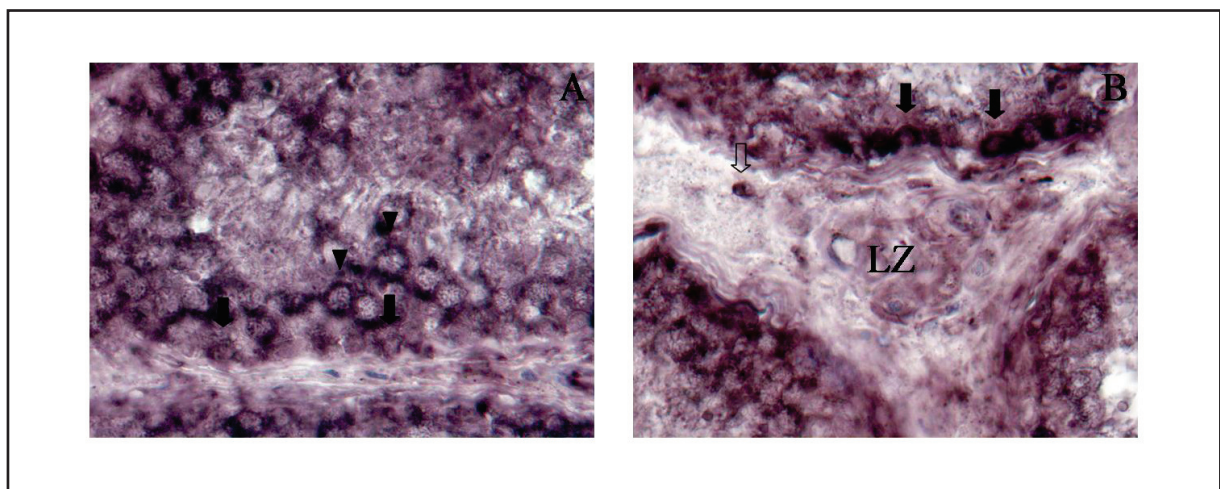
**Abb. 6:** Nachweis der ER $\alpha$ -mRNA an mikrodisssektiertem humanem Hodengewebe mittels RT-PCR.

M = 50 bp Marker, 1 = Homogenat nsp, 2 = Tubuli nsp, 3 = Interstitium nsp, 4 = Homogenat sco, 5 = Tubuli sco, 6 = Interstitium sco, 7 = Wasserleerprobe.



#### 4.2 ISH ER $\alpha$

Mittels ISH an Paraffinschnitten mit nsp konnte der Nachweis von ER $\alpha$ -mRNA im menschlichen Hoden erbracht werden. In den Keimtubuli (Abb. 7A) konnte in Spermatogonien und primären Spermatozyten eine spezifische zytoplasmatische Färbung nachgewiesen werden. Spermatiden und Sertoli-Zellen zeigten keine RNA-Markierung. Im Interstitium (Abb. 7B) konnte in einzelnen Leydig-Zellen ein spezifisches Signal detektiert werden. Schnitte, die mit der sense cRNA-Sonde inkubiert worden waren, zeigten keine spezifische Färbung.



**Abb. 7:** Nachweis der zellulären Lokalisation der ER $\alpha$ -mRNA mittels ISH an Paraffinschnitten mit nsp (Mensch) (Primärvergrößerung x40).

Signal im Zytoplasma von Spermatogonien (schwarze Pfeile), primären Spermatozyten (Pfeilspitzen) und vereinzelt in interstitiellen Zellen (durchsichtiger Pfeil). LZ = Leydig-Zellen.

### **4.3 IHC ER $\alpha$**

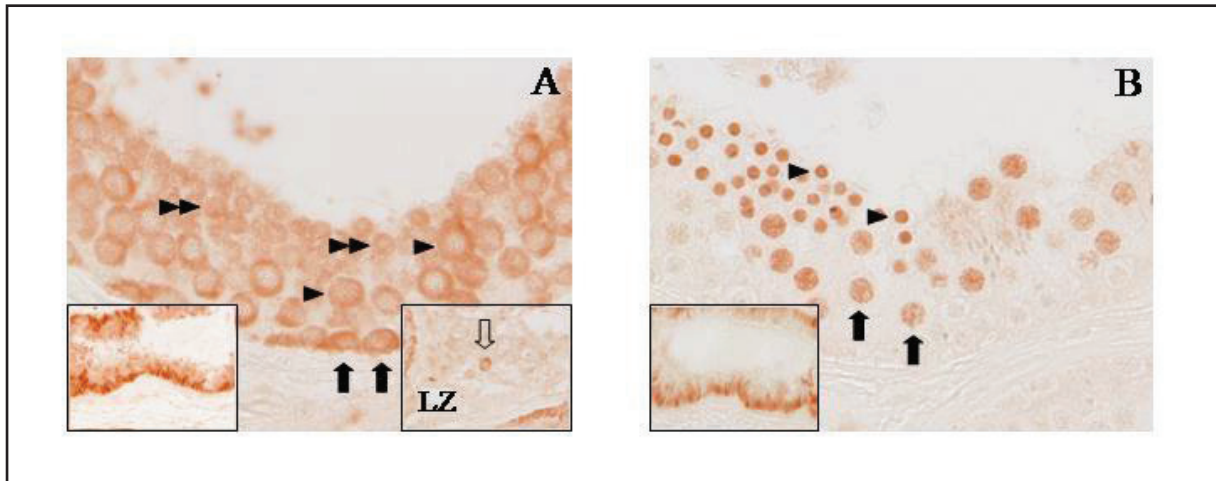
Der Nachweis des ER $\alpha$  auf Proteinebene erfolgte an Paraffinschnitten mit nsp oder TIN unter Verwendung sechs verschiedener Antikörper (siehe Tab. 4) und der ABC-Methode. Die Wahl der Antikörper richtete sich nach dem Vorkommen in der Literatur und nach ihrer unterschiedlichen Epitopenerkennung.

#### **4.3.1 HC-20-Antikörper**

In Keimtubuli mit nsp konnte ein reproduzierbares Signal im Zytoplasma von Spermatogonien, späten pachytänen Spermatozyten und frühen runden Spermatiden nachgewiesen werden (Abb. 8A). Im Interstitium von Schnitten mit nsp detektierte der Antikörper das ER $\alpha$ -Protein im Zytoplasma von vereinzelt Leydig-Zellen (Einschub rechts Abb. 8). Die als Positivkontrolle dienenden Ductuli efferentes des Nebenhodens wiesen eine nukleäre Färbung der Epithelzellen auf (Einschub links Abb. 8A). Negativkontrollen zeigten kein spezifisches Signal. In Keimtubuli mit TIN zeigte sich eine Immunreaktion für ER $\alpha$  im Zytoplasma von TIN-Zellen (Abb. 9B).

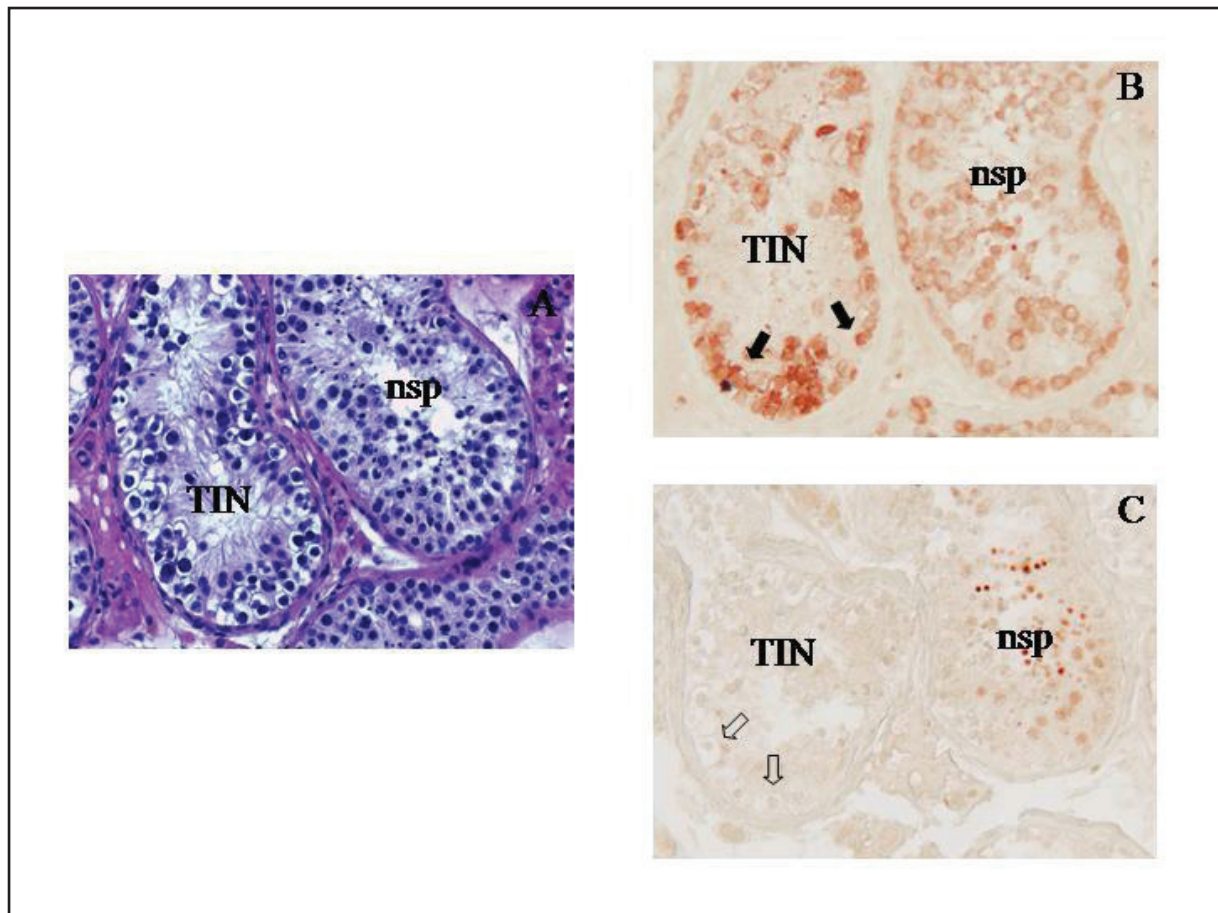
#### **4.3.2 F-10-Antikörper**

In Keimtubuli mit nsp konnte eine deutliche Immunreaktion für ER $\alpha$  in den Zellkernen später pachytäner Spermatozyten und runder Spermatiden nachgewiesen werden (Abb. 8B). Die als Positivkontrolle dienenden Ductuli efferentes zeigten eine Kernfärbung in den Epithelzellen (Einschub Abb. 8B). Negativkontrollen wiesen kein spezifisches Signal auf. In Keimtubuli mit TIN ließ sich kein reproduzierbares Signal detektieren (Abb. 9C).



**Abb. 8:** Immunhistochemischer Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins mittels HC-20- (A) und F-10-Antikörper (B) an Paraffinschnitten mit nsp (Mensch) (A und B Primärvergrößerung x40, Einschübe in Abb. A und B Primärvergrößerung x20).

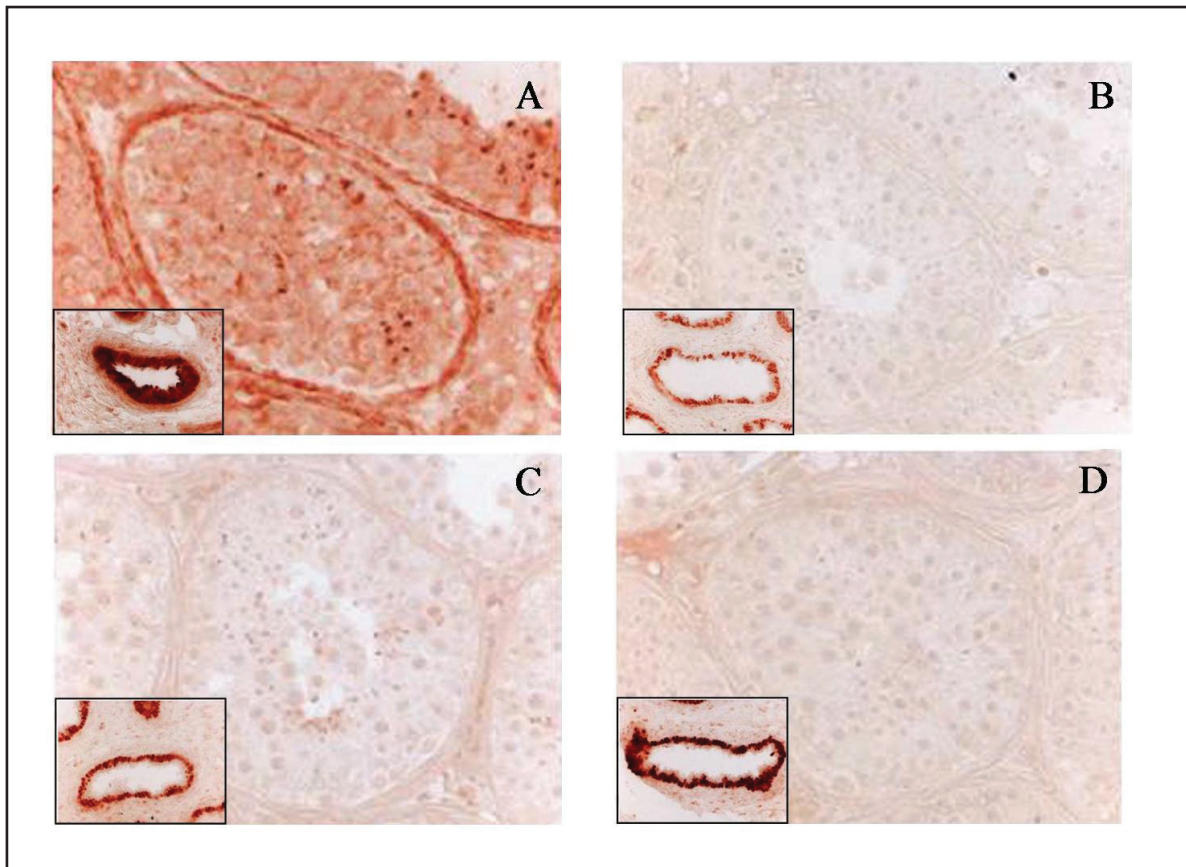
Mittels HC-20-Antikörper (Abb. A) erkannte man ein spezifisches Signal im Zytoplasma von Spermatogonien (schwarze Pfeile), späten pachytänen Spermatozyten (Pfeilköpfe) und frühen runden Spermatiden (doppelte Pfeilköpfe). Außerdem konnte in einzelnen interstitiellen Zellen (Einschub rechts, Abb. A) eine zytoplasmatische Färbung festgestellt werden (durchsichtiger Pfeil). Mittels F-10-Antikörper (Abb. B) war das Protein im Zellkern von späten pachytänen Spermatozyten (schwarze Pfeile) und runden Spermatiden nachweisbar (Pfeilköpfe). Beide Antikörper zeigten eine nukleäre Färbung in den Epithelzellen der Ductuli efferentes (Einschübe links, Abb. A und B). LZ = Leydig-Zellen.



**Abb. 9:** Immunhistochemischer Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins mittels HC-20- (B) und F-10-Antikörper (C) an Paraffinschnitten mit TIN (Mensch) (Primärvergrößerung x 40). Mittels HC-20-Antikörper konnte im Zytoplasma von TIN-Zellen ein Signal detektiert werden (schwarze Pfeile) (B). Mittels F-10-Antikörper war in Tubuli mit TIN kein reproduzierbares Signal zu erkennen (C). Abb. A HE-Färbung eines TIN- und nsp-Tubulus.

#### 4.3.3 H-184-, 1F3-, 1D5- und 60C-Antikörper

In Keimtubuli mit nsp konnte mit keinem der Antikörper ein reproduzierbares Signal detektiert werden. Lediglich in den Epithelzellen der Ductuli efferentes des Nebenhodens zeigte sich eine deutliche Kernfärbung (Abb. 10).



**Abb. 10:** Immunhistochemischer Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins mittels H-184- (A), 1F3- (B), 1D5- (C) und 60C-Antikörper (D) an Paraffinschnitten mit nsp (Mensch) (A - D Primärvergrößerung x 40; Einschübe in A - D Primärvergrößerung x 20).

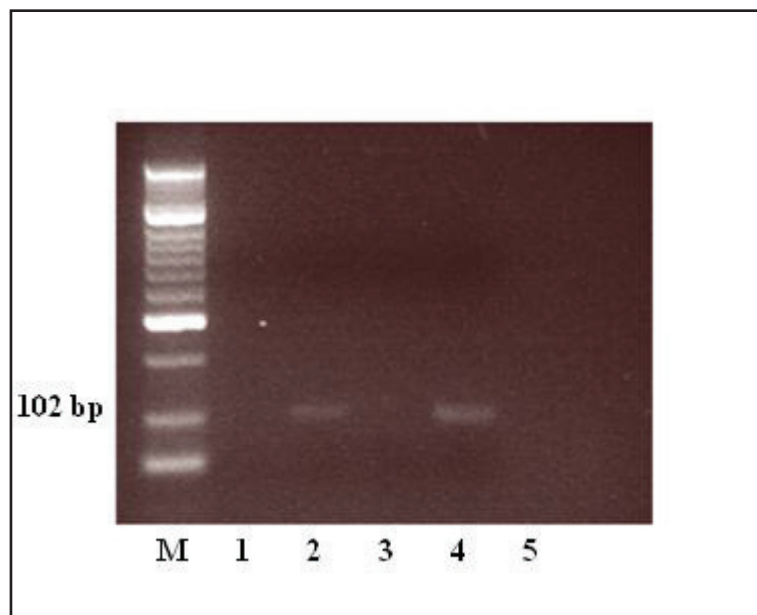
Im Hoden konnte kein spezifisches Signal nachgewiesen werden (A - D). In den Epithelzellen der Ductuli efferentes war eine nukleäre Färbung deutlich sichtbar (Einschübe in A - D).



#### 4.4 RT-PCR von Paraffinschnitten mit nsp und TIN

Zur Verifizierung der zytoplasmatischen Färbung des HC-20-Antikörpers wurden Paraffinschnitte mit nsp und TIN nach RNA-Extraktion einer ER $\alpha$ -RT-PCR unterzogen. Ein Ansatz mit sterilem Aqua bidest diente als methodische Negativkontrolle.

Mittels RT-PCR für ER $\alpha$  konnte in oben genanntem Gewebe ein spezifisches Produkt von 102 bp nachgewiesen werden (Abb. 11). Die Wasserleerprobe war negativ.



**Abb. 11:** Nachweis der ER $\alpha$ -mRNA an humanem Hodenhomogenat von einem Patienten mit nsp bzw. TIN.

M = 50 bp Marker,      1 = -RT TIN,      2 = +RT TIN,      3 = -RT nsp,      4 = +RT nsp,  
5 = Wasserleerprobe.

## **4.5 RT-Nested-PCR**

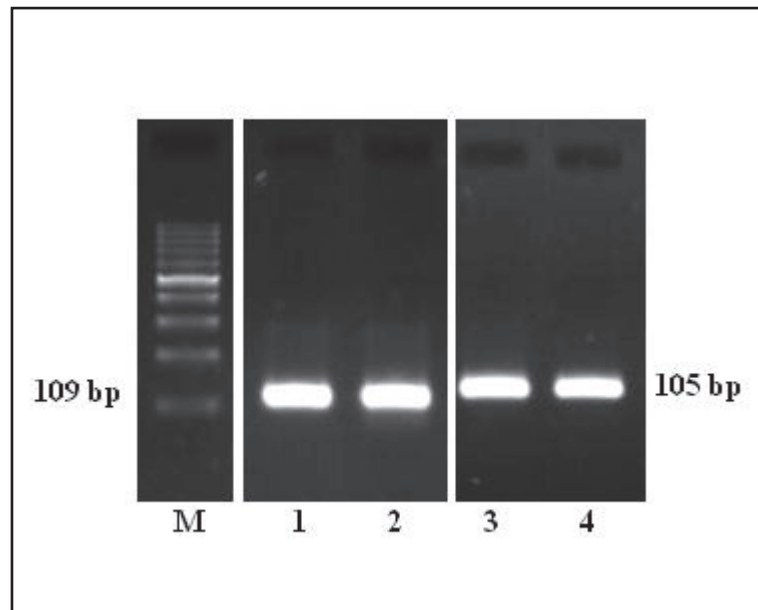
Für die Charakterisierung immunopositiver interstitieller Zellen wurde zunächst eine ER $\alpha$ -IHC (HC-20-Antikörper) an Paraffinschnitten mit nsp vorgenommen. Anschließend erfolgte die Isolierung der immunopositiven interstitiellen Zellen mittels UV-LAM. Nach RNA-Extraktion aus dem mikrodisektierten Gewebe erfolgte eine RT-Nested-PCR mit Primerpaaren für ER $\alpha$  und StAR.

### **4.5.1 ER $\alpha$**

Mittels RT-Nested-PCR mit den Primerpaaren für ER $\alpha$  konnte in gepickten immunopositiven interstitiellen Zellen ein spezifisches Produkt von 109 bp nachgewiesen werden (Abb. 12, Spur 2). Dadurch konnte die zytoplasmatische Markierung des HC-20-Antikörpers verifiziert werden. Ein als Positivkontrolle dienender Paraffinschnitt zeigte ebenfalls ein spezifisches Produkt von 109 bp (Abb. 12, Spur 1). Die Wasserleerprobe war negativ.

### **4.5.2 StAR**

Die RT-Nested-PCR mit den Primerpaaren für StAR zeigte für die gepickten immunopositiven interstitiellen Zellen ein spezifisches Produkt von 105 bp (Abb. 12, Spur 4). Dadurch konnten die interstitiellen Zellen als Leydig-Zellen charakterisiert werden, da StAR ein spezifisches Protein dieser Zellen im Hoden darstellt (Dong et al., 2011; Clark et al., 1994). Ein als Positivkontrolle dienender Paraffinschnitt zeigte ebenfalls ein spezifisches Produkt von 105 bp (Abb. 12, Spur 3). Die Wasserleerprobe war negativ.



**Abb. 12:** Nachweis der ER $\alpha$ - und StAR-mRNA an immunhistochemisch gefärbten und anschließend mikrodisektierten interstitiellen Zellen im humanen Hoden mittels RT-Nested-PCR.

M = 100 bp Marker, 1 = spezifisches Produkt für ER $\alpha$  in einem Paraffinschnitt nach IHC gegen ER $\alpha$ , 2 = spezifisches Produkt für ER $\alpha$  in einzelnen interstitiellen Zellen nach IHC und UV-LAM, 3 = spezifisches Produkt für StAR in einem Paraffinschnitt nach IHC gegen ER $\alpha$ , 4 = spezifisches Produkt für StAR in einzelnen interstitiellen Zellen nach IHC und UV-LAM.

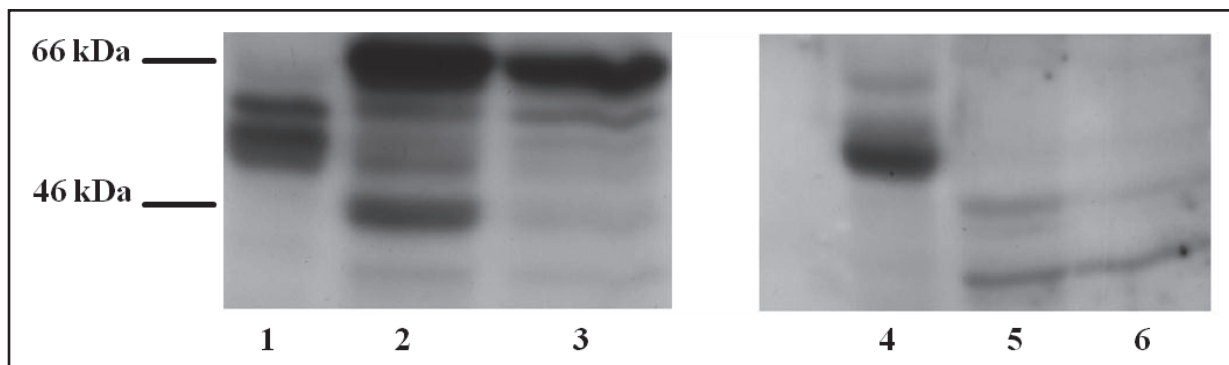


## 4.6 IB ER $\alpha$

Der Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins an Hodenhomogenat aus Gefriermaterial erfolgte mit Hilfe sechs unterschiedlicher Antikörper (siehe Tab. 4). Es wurden monomorphe Biopsien von Patienten mit nsp verwendet. Als Positivkontrolle dienten MCF-7- und T47D-Zellen. Das zu erwartende Molekulargewicht des Rezeptors liegt bei 66 kDa. Seine leichtere Variante hat ein Molekulargewicht von 46 kDa.

### 4.6.1 HC-20-Antikörper

In Hodengewebe von Patienten mit nsp konnte mittels HC-20-Antikörper keine spezifische Bande für ER $\alpha$  detektiert werden (Abb. 13, Spur 1). In MCF-7- und T47D-Zellen detektierte der Antikörper deutliche Banden bei 66 und 46 kDa (Abb. 13, Spur 2 und 3). Die Inkubation mit Blockingpeptiden zeigte keine spezifischen Banden (Abb. 13, Spur 4, 5 und 6).

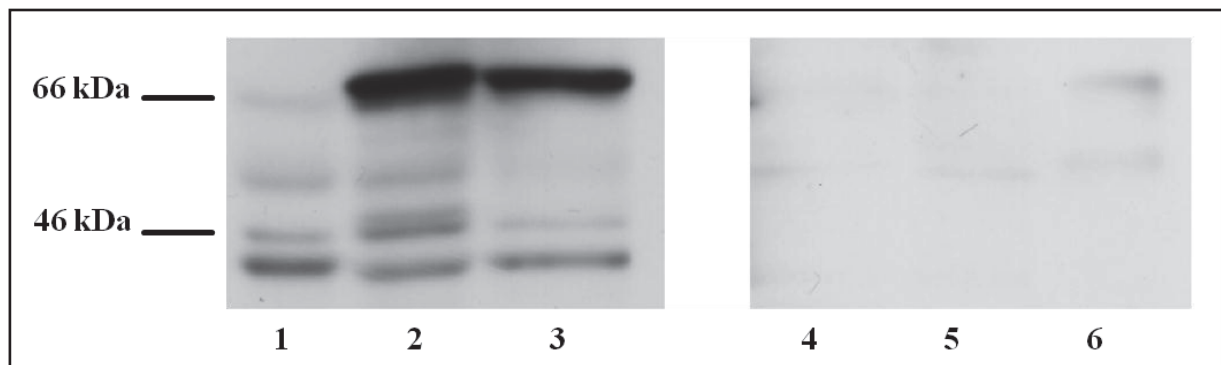


**Abb. 13:** Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins an humanem Hodenhomogenat mit nsp sowie an MCF-7- und T47D-Zellen mittels HC-20-Antikörper.

1 = Hodenhomogenat, 2 = MCF-7-Zellen, 3 = T47D-Zellen, 4 = Blockingpeptid Hodenhomogenat, 5 = Blockingpeptid MCF-7-Zellen, 6 = Blockingpeptid T47D-Zellen.

#### 4.6.2 F-10-Antikörper

Mittels F-10-Antikörper konnten in Hodengewebe von Patienten mit normaler Spermatogenese zwei spezifische Banden für ER $\alpha$  bei einem Molekulargewicht von 66 und 46 kDa detektiert werden (Abb. 14, Spur 1). In MCF-7- und T47D-Zellen zeigten sich ebenfalls zwei deutliche Banden bei den erwarteten Molekulargewichten (Abb. 14, Spur 2 und 3). Die Inkubation mit Blockingpeptiden zeigte keine spezifischen Banden (Abb. 14, Spur 4, 5 und 6).

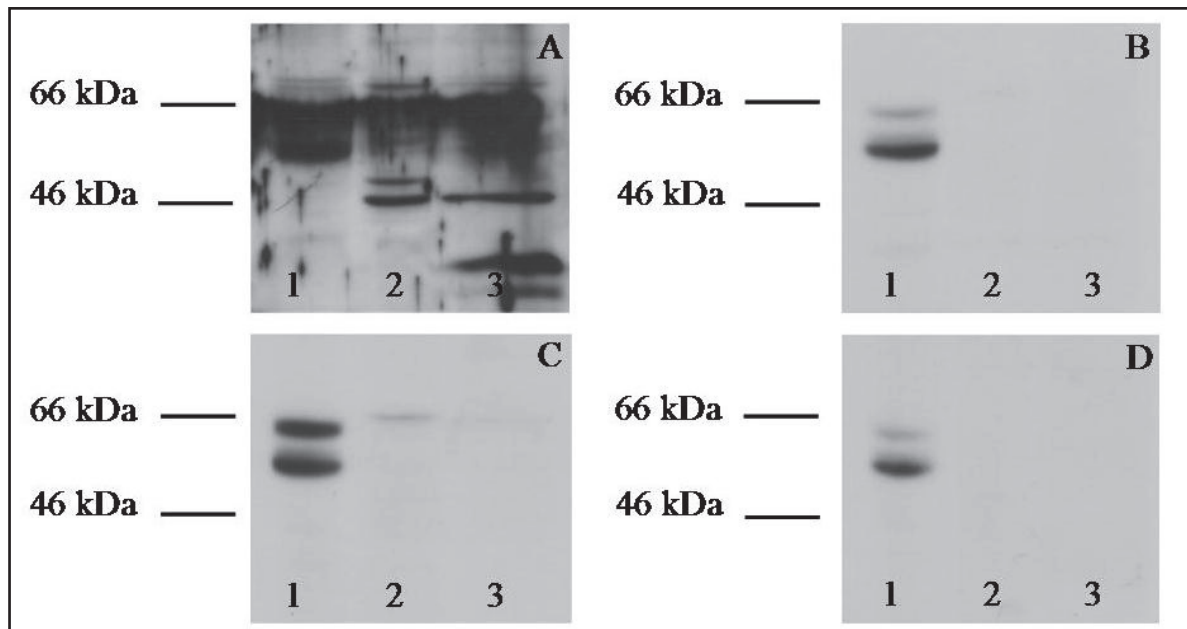


**Abb. 14:** Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins an humanem Hodenhomogenat mit nsp sowie an MCF-7- und T47D-Zellen mittels F-10-Antikörper.

1 = Hodenhomogenat, 2 = MCF-7-Zellen, 3 = T47D-Zellen, 4 = Blockingpeptid Hodenhomogenat, 5 = Blockingpeptid MCF-7-Zellen, 6 = Blockingpeptid T47D-Zellen.

#### 4.6.3 H-184-, 1F3-, 1D5- und 60C-Antikörper

Mit Hilfe dieser Antikörper konnte kein Nachweis des ER $\alpha$  auf Proteinebene erbracht werden (Abb. 15).



**Abb. 15:** Nachweis des ER $\alpha$ -Proteins an humanem Hodenhomogenat mit nsp sowie an MCF-7- und T47D-Zellen mittels H-184- (A), 1F3- (B), 1D5- (C) und 60C-Antikörper (D). 1 = Hodenhomogenat, 2 = MCF-7-Zellen, 3 = T47D-Zellen.

#### 4.7 RT-qPCR ER $\alpha$

Mittels RT-qPCR wurde die Expression des ER $\alpha$  in Hoden mit nsp mit jener in Hoden mit Spermatogenesedefekten verglichen (siehe Tab. 11 und Abb. 16).

Die Befunde zeigten, dass die ER $\alpha$ -mRNA-Expression in Hodenbiopsien mit Spermatogenesedefekten im Vergleich zu jener in Biopsien mit nsp abnimmt.

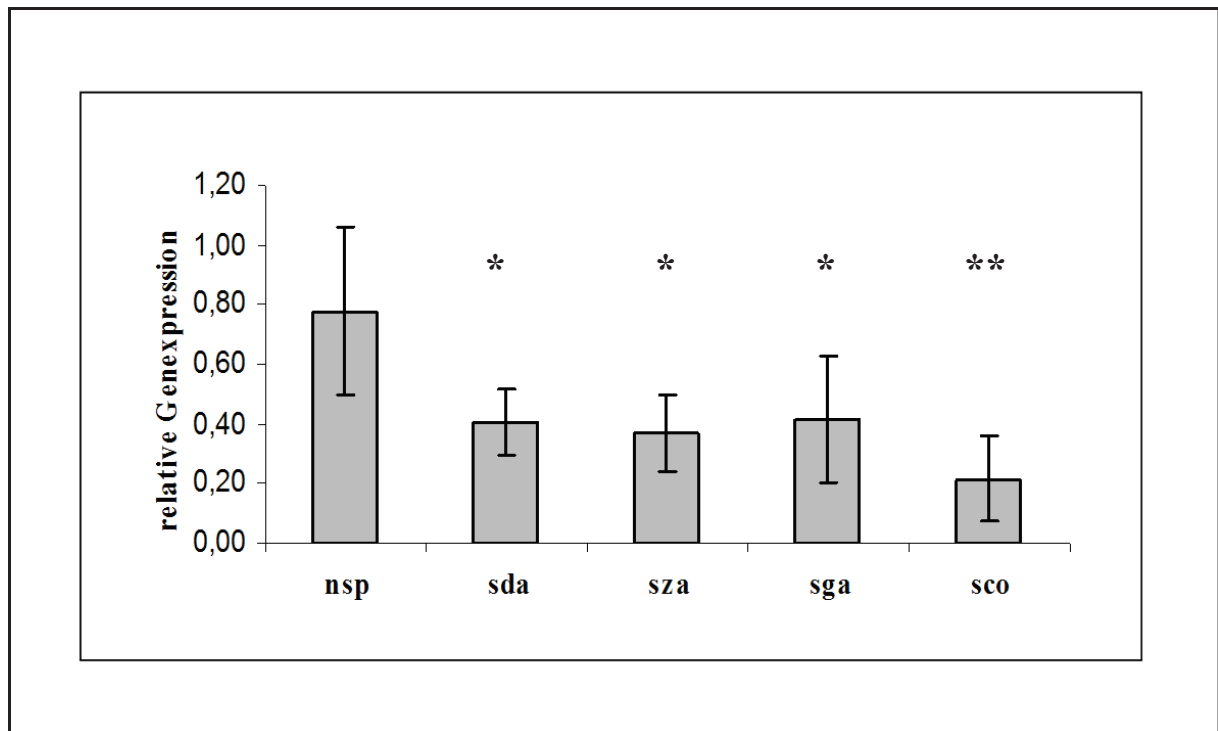
**Tab. 11:** Expressionswerte für ER $\alpha$  bei Patienten mit nsp, sda, sza, sga und sco.

n = Anzahl der verwendeten Biopsien pro Diagnose, Mwt = arithmetischer Mittelwert, SD = Standardabweichung.

\* bezeichnet die Werte, die einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Wert nsp anzeigen.

\*\* bezeichnet den Wert, der einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zum Wert nsp anzeigt.

n	Diagnose	Relative Expressionswerte ER $\alpha$	
		Mwt	SD
5	nsp	0,78	0,28019
5	sda	0,41*	0,11173
5	sza	0,37*	0,13325
5	sga	0,42*	0,20903
5	sco	0,22**	0,14326



**Abb. 16:** Relative Genexpression von ER $\alpha$  bei unterschiedlichen histologischen Diagnosen im humanen Hoden.

\* =  $p < 0,05$  in Bezug auf nsp , \*\* =  $p < 0,001$  in Bezug auf nsp.

#### 4.8 RT-qPCR ER $\alpha$ , ER $\beta$ und GPER im Vergleich

Mittels RT-qPCR wurde die Expression des ER $\alpha$ , des ER $\beta$  und des GPER in Hoden mit nsp mit jener in Hoden mit Spermatogenesedefekten verglichen (siehe Tab. 12 und Abb 17).

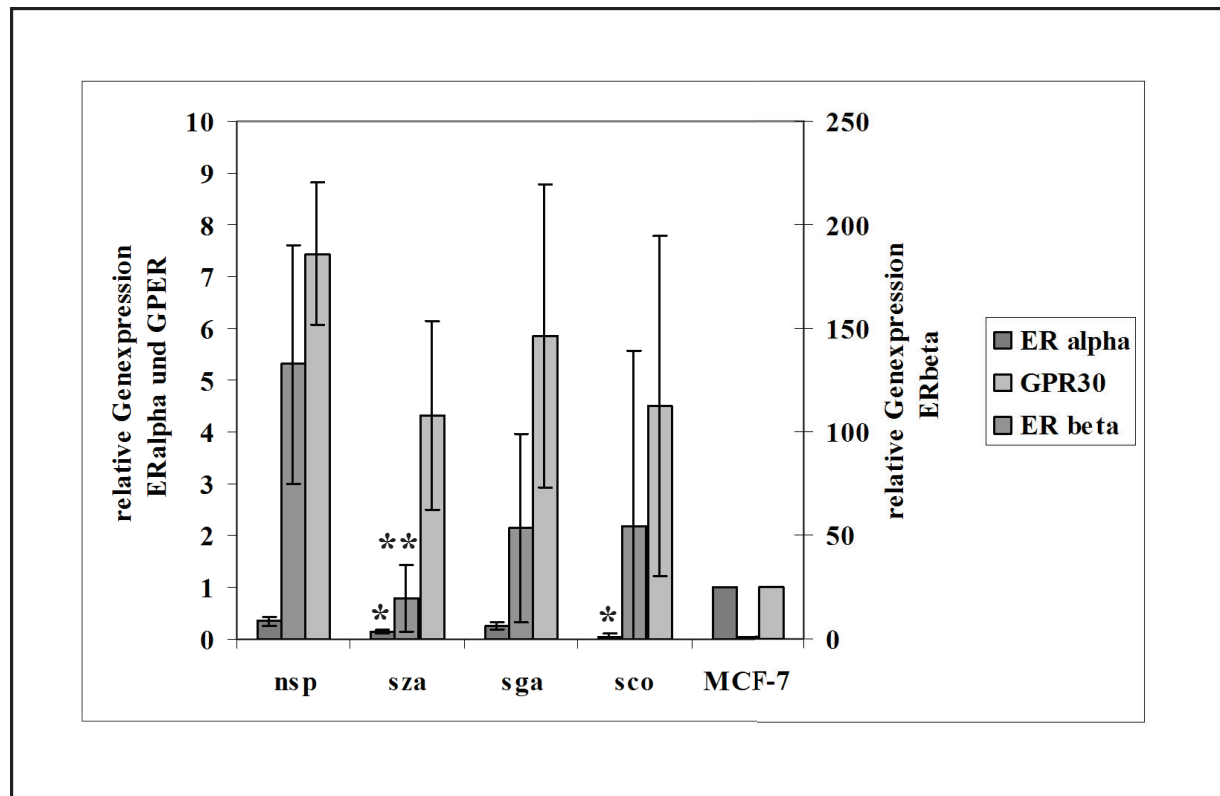
Die Befunde der ER $\alpha$ -mRNA-Expression waren vergleichbar mit oben genannten Ergebnissen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression in Hodengewebe mit nsp im Vergleich zu jener in Hodengewebe mit sza und sco. Zudem war die ER $\alpha$ -Expression in MCF-7-Zellen deutlich höher als in Hodengewebe. Die Expression des ER $\beta$  und des GPER in Hodengewebe war sehr viel höher als die des ER $\alpha$ . Die ER $\beta$ -Expression war in Proben mit nsp signifikant höher, als in Proben mit sza. Für die Expression des GPER wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die ER $\beta$ - und GPER-Expressionen in MCF-7-Zellen waren deutlich niedriger als in Hodengewebe.

**Tab. 12:** Expressionswerte für ER $\alpha$ , ER $\beta$  und GPER bei Patienten mit nsp, sza, sga und sco. n = Anzahl der verwendeten Biopsien pro Diagnose, Mwt = arithmetischer Mittelwert, SD = Standardabweichung.

\* bezeichnet die Werte, die einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zum Wert nsp anzeigen.

\*\* bezeichnet den Wert, der einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Wert nsp anzeigt.

n	Diagnose	Relative Expressionswerte					
		ER $\alpha$		ER $\beta$		GPER	
		Mwt	SD	Mwt	SD	Mwt	SD
5	nsp	0,35	0,08	132,72	57,86	7,44	1,37
5	sza	0,14*	0,03	19,77**	15,89	4,32	1,81
5	sga	0,26	0,06	53,72	45,46	5,85	2,94
5	sco	0,04*	0,06	54,17	85,56	4,50	3,28
4	MCF-7	1	0	1	0	1	0



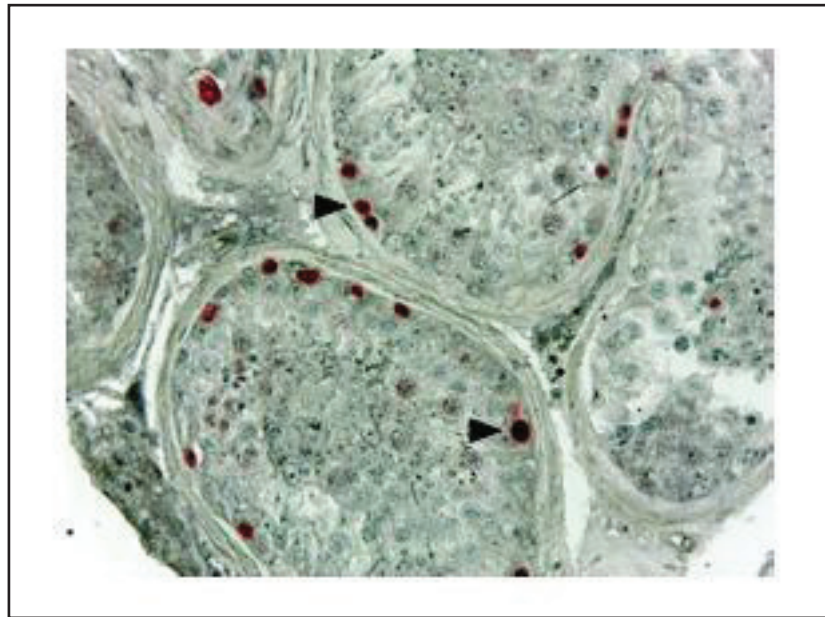
**Abb. 17:** Relative Genexpression von ER $\alpha$ , ER $\beta$  und GPER bei unterschiedlichen histologischen Diagnosen im humanen Hoden.

Genexpression ER $\alpha$ : \* =  $p < 0,001$  im Vergleich zu nsp. Genexpression ER $\beta$ : \*\* =  $p < 0,05$  im Vergleich zu nsp. Genexpression GPER: keine Signifikanzen.

#### 4.9 IHC Ki-67

Der Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 erfolgte an Paraffinschnitten mit unterschiedlichen histologischen Diagnosen unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers und der APAAP-Methode.

In den Keimtubuli zeigte sich ein reproduzierbares Signal in den Kernen der mitotisch aktiven Spermatogonien (Abb. 18). Negativkontrollen zeigten kein spezifisches Signal.



**Abb. 18:** Immunhistochemischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 an einem Paraffinschnitt mit nsp (Mensch) (Primärvergrößerung x 40).

In den Kernen mitotisch aktiver Spermatogonien zeigte sich ein reproduzierbares Signal (Pfeilspitzen).



#### 4.10 Histomorphometrische Analyse an Ki-67-gefärbten Paraffinschnitten und Zusammenhang zwischen mitotischer Aktivität und peripherem Östrogenwert

Die histomorphometrische Analyse an Ki-67-gefärbten Paraffinschnitten zeigte, dass Tubuli mit hyp ( $24,9 \% \pm 12,4$ ), sda ( $21,1 \% \pm 14,6$ ), sza ( $24,7 \% \pm 14,0$ ) oder sga ( $18,2 \% \pm 13,4$ ) im Vergleich zu Tubuli mit nsp ( $27,5 \% \pm 12,2$ ) eine signifikante Abnahme ( $p < 0,01$ ) immunopositiver Spermatogonien aufweisen (siehe Tab. 13).

**Tab. 13:** Prozentsätze Ki-67-immunopositiver Spermatogonien in Keimtubuli mit nsp, hyp, sda, sza und sga.

n = Gesamtzahl an Keimtubuli in allen ausgewerteten Biopsien, Mwt = arithmetischer Mittelwert, SD = Standardabweichung.

\* bezeichnet die Werte, die einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zum Wert nsp anzeigen.

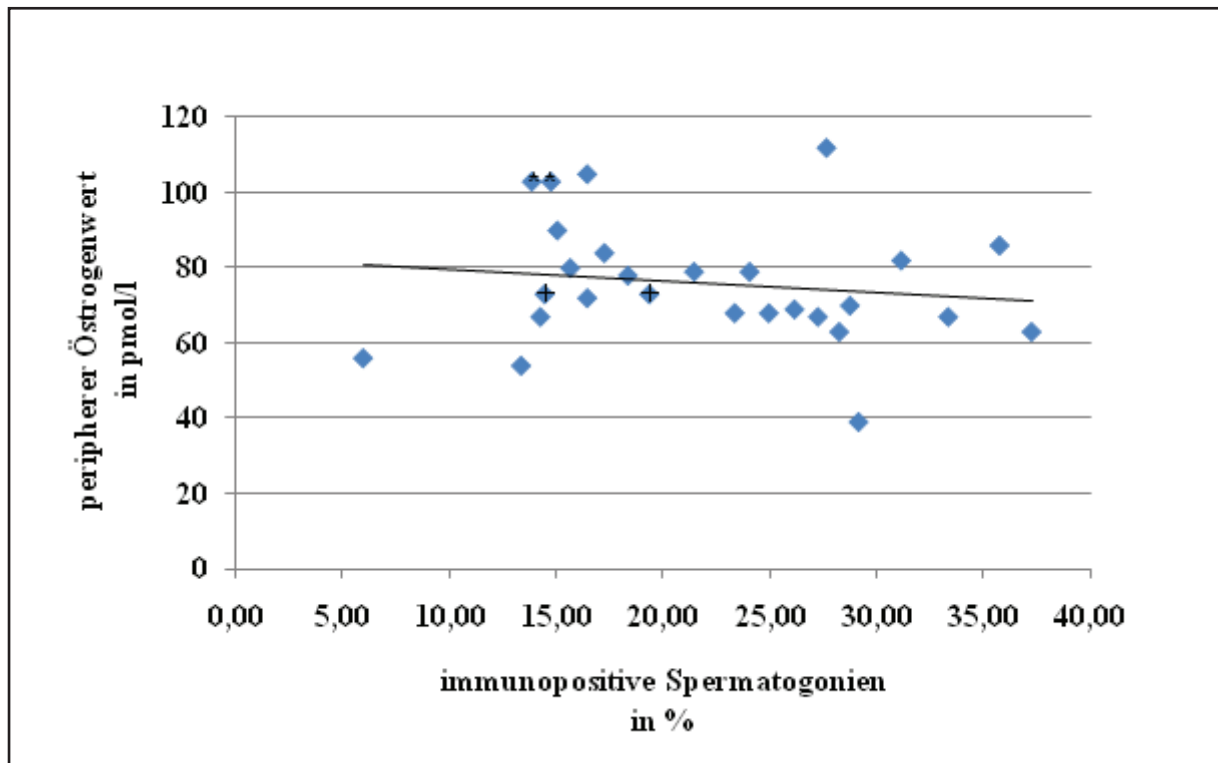
n	Diagnose	Mwt (%)	SD (%)
221	nsp	27,5	12,2
345	hyp	24,9*	12,4
69	sda	21,1*	14,6
128	sza	24,7*	14,0
24	sga	18,2*	13,4

Die arithmetischen Mittelwerte mit dazugehörigen Standardabweichungen Ki67-immunopositiver Spermatogonien pro Biopsie sind mit den entsprechenden Östrogenwerten in Tab. 14 aufgelistet. Der Korrelationskoeffizient von -0,1495 und die Präsentation der Daten in Abb. 19 zeigen keinen aussagekräftigen Zusammenhang zwischen dem Mittelwert und dem peripheren Östrogenwert.

**Tab. 14:** Prozentsätze Ki-67-immunopositiver Spermatogonien in Paraffinschnitten mit nsp, hyp, sda, sza und sga sowie entsprechendem peripherem Östrogenwert.

Mwt = arithmetischer Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Biopsie- /Patientennummer	Diagnose	immunopositive Spermatogonien		peripherer Östrogenwert (pmol/l)
		Mwt (%)	SD (%)	
1/1	hyp	16,5	9,9	72
2/2	nsp	18,4	10,5	78
3/3	hyp	15,1	10,4	90
4/4	sda	13,9	13,0	103
5/4	sda	14,8	9,9	103
6/5	sza	14,5	7,7	73
7/5	sza	19,4	9,0	73
8/6	sza	26,2	13,7	69
9/7	hyp	17,3	10,1	84
10/8	hyp	23,4	11,8	68
11/9	hyp	15,7	10,8	80
12/10	hyp	29,2	14,5	39
13/11	sza	37,3	18,1	63
14/12	sza	28,3	14,7	63
15/13	nsp	25,0	10,2	68
16/14	hyp	33,4	10,8	67
17/15	hyp	27,7	11,5	112
18/16	hyp	21,5	13,4	79
19/17	hyp	31,2	11,6	82
20/18	hyp	28,8	9,7	70
21/19	hyp	35,8	13,2	86
22/20	hyp	14,3	6,7	67
23/20	hyp	27,3	9,4	67
24/21	sga	24,1	10,6	79
25/22	sga	13,4	5,3	54
26/23	sga	6,0	2,4	56
27/24	sga	16,5	10,3	105



**Abb. 19:** Zusammenhang zwischen dem arithmetischen Mittelwert immunopositiver Spermatogonien einzelner Patienten und dem entsprechenden peripheren Östrogenwert. Korrelationskoeffizient = -0,150,  $p = 0,457$ .

Blaue Rauten = Biopsie, \*\* = ein Patient, ++ = ein Patient.

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die präzise zelluläre Lokalisation und Expression des ER $\alpha$  im humanen Hoden. Mittels ISH und RT-PCR nach UV-LAM sowie mittels IHC und Immunoblot sollte der Rezeptor sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Außerdem konnte, laut Literatur, zum ersten Mal das quantitative Expressionsmuster des ER $\alpha$ , des ER $\beta$  sowie des GPER bei normaler und gestörter Spermatogenese belegt werden. Zusätzlich ermittelte die Arbeit den Zusammenhang zwischen der mitotischen Aktivität der Spermatogonien und dem peripheren Östrogenwert im Blut.

Mittels IHC konnte der ER $\alpha$  in Kernen von späten pachytänen Spermatozyten und runden Spermatiden (F-10-Antikörper), sowie im Zytoplasma von Spermatogonien, späten pachytänen Spermatozyten, runden Spermatiden und vereinzelt in Leydig-Zellen (HC-20-Antikörper) nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle dienten Paraffinschnitte von Hodenpräparaten, die Anschnitte von Ductuli efferentes aufwiesen, in denen beide Antikörper, sowie vier weitere Antikörper (H-184, 1F3, 1D5 und 60C) die Kerne der Epithelzellen deutlich anfärbten. Die zytoplasmatische Lokalisation des Rezeptors (HC-20-Antikörper) hatte die Durchführung einer RT-PCR mit spezifischen ER $\alpha$ -Primern von immunopositiven TIN-Zellen, sowie eine RT-Nested-PCR nach UV-LAM von immunopositiven interstitiellen Zellen zur Folge.

Hierbei konnte die Rezeptor-mRNA nachgewiesen werden und die vereinzelt gefärbten Zellen des Interstitiums als Leydig-Zellen identifiziert werden. In der Immunoblot-Analyse war lediglich der F-10-Antikörper sensitiv genug, um in menschlichem Hodengewebe das ER $\alpha$ -Protein (66 kDa) und seine leichtere Isoform (46 kDa) nachzuweisen. In MCF-7- bzw. T47D-Brustkrebs-Zelllinien konnten beide Antikörper (HC-20 und F-10) zwei spezifische Banden mit einem Molekulargewicht von 66 und 46 kDa produzieren. Das Vorkommen der Rezeptor-mRNA in Keimzellen wurde mittels ISH und RT-PCR nach UV-LAM bestätigt. Die ISH zeigte eine deutliche zytoplasmatische Färbung in Spermatogonien und primären Spermatozyten, sowie vereinzelt in Leydig-Zellen. Durch die RT-PCR von gepickten Keimtubuli (mit nsp oder sco) sowie Interstitium konnte nur in Tubuli seminiferi mit nsp eine Rezeptorexpression nachgewiesen werden, nicht aber in Tubuli seminiferi mit sco bzw. in interstitiellem Gewebe.

In der Literatur wurden verschiedenste Lokalisationsmuster des ER $\alpha$  unter Verwendung unterschiedlicher Methoden und Antikörper beschrieben (Übersicht in Tab. 1).

Pelletier und El-Alfy (2000) konnten das Rezeptorprotein mittels IHC unter Verwendung des HC-20-Antikörpers in Kernen von Leydig-Zellen nachweisen. In vorliegender Arbeit zeigte sich mit dem gleichen Antikörper vereinzelt eine Färbung in Leydig-Zellen, die allerdings zytoplasmatisch war. Unterschiede zwischen genannten Arbeiten bestanden in der Gewebefixierung (Pelletier und El-Alfy: Formalin-Fixierung; vorliegende Arbeit: Bouin-Fixierung). Eine spezifische Färbung der Ductuli efferentes-Epithelzellen wurde von Pelletier und El-Alfy (2000) nicht erzielt, war aber in vorliegender Arbeit mit oben genanntem Antikörper eindeutig und wurde z.B. von Saunders et al. (2001) ebenfalls beschrieben.

Pentikäinen et al. (2000) wiesen den ER $\alpha$  im Zytoplasma von zygotänen und frühen pachytänen primären Spermatozyten, sowie in frühen elongierten Spermatiden nach. Sie verwendeten unterschiedliche mono- und polyklonale Antikörper, unter anderem auch den hier verwendeten HC-20-Antikörper. In vorliegender Arbeit wurde der Rezeptor im gleichen Zellkompartiment, aber teilweise in anderen Zelltypen nachgewiesen (späte pachytäne Spermatozyten, frühe runde Spermatiden, Spermatogonien, vereinzelte interstitielle Zellen). Dies könnte auf die bessere Gewebeerhaltung und histologische Evaluation des Paraffinschnittes im Gegensatz zu den von Pentikäinen et al. (2000) verwendeten Quetschpräparaten zurückzuführen sein. Deren Western Blot-Analyse ergab in Hodengewebe eine deutliche Bande von 80 kDa, welche bisher nur von Pink et al. (1996) beschrieben wurde. Mit dem HC-20-Antikörper konnten außerdem zwei zusätzliche schwache Banden von 50-55 kDa und mit dem H-184-Antikörper eine zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht von 60 kDa detektiert werden. Diese Ergebnisse bestätigten sich in vorliegender Arbeit nicht und finden bisher in der Literatur keine Beschreibung.

Taylor und Al-Azzawi (2000) wiesen beide Rezeptortypen auf Proteinebene mittels IHC nach. Sie verwendeten Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe sowie einen monoklonalen Maus-anti-Rind-Antikörper. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der ER $\alpha$  im menschlichen Hoden in Kernen von Sertoli- und Leydig-Zellen nachweisbar war. Vorliegende Arbeit bestätigte die, wenn auch zytoplasmatische Lokalisation in vereinzelter Leydig-Zellen, widerlegte aber mehrfach die Lokalisation und Expression des Rezeptors in Sertoli-Zellen mittels IHC, ISH sowie RT-PCR nach UV-LAM.

Saunders et al. (2001) verwendeten Hodengewebe, welches für die IHC, genau wie in vorliegender Arbeit in Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet wurde. Weiterhin kam ein monoklonaler Antikörper aus der Maus zum Einsatz. Dieser bestätigte seine Funktionalität durch eine deutliche Kernfärbung der Leydig-Zellen in adulten Rattenhoden, beschrieben bei Fisher et al. (1997) und der Ductuli efferentes-Epithelzellen,

welche auch in dieser Arbeit vorlag. Im menschlichen Hoden wurde das ER $\alpha$ -Protein mittels IHC allerdings nicht nachgewiesen. Mittels Western Blot-Analyse konnte es jedoch in einer einzigen humanen Hodengewebsprobe sehr schwach detektiert werden. Die Bande zeigte sich bei dem erwarteten Molekulargewicht von 66 kDa. Ein Nachweis auf mRNA-Ebene fehlte.

Mäkinen et al. (2001) benutzten für die IHC kryokonserviertes humanes Hodengewebe, wobei es sich hauptsächlich um Hoden mit Hypospermatogenese handelte. Formalin-fixiertes und in Paraffinwachs eingebettetes Uterusgewebe von Mensch und Maus diente als Positivkontrolle. Sie verwendeten zwei monoklonale Antikörper aus der Maus, unter anderem den hier gebrauchten 1D5-Klon von Dako. Die Arbeitsgruppe konnte in keiner Zelle des menschlichen Hodens eine positive Immunreaktion für das Rezeptorprotein finden. Allerdings zeigte sich an Paraffinschnitten von adulten Mäusehoden eine Färbung in Leydig-Zellkernen, die mit Ergebnissen von Zhou et al. (2002) übereinstimmte. Außerdem wiesen beide Positivkontrollen eine spezifische Färbung für den Östrogenrezeptor auf. Ein Nachweis auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR von humanem Hodengewebe konnte nicht erbracht werden.

In der Arbeit von Han et al. (2009) wurde der Nachweis des ER $\alpha$  in Hodenbiopsien von Männern mit obstruktiver Azoospermie (n = 10), Reifungshemmung (n = 10) oder sco (n = 8) mittels Immunfluoreszenz (IF) und Western Blot-Analyse erbracht. Hierbei wurde, wie auch in vorliegender Arbeit, der polyklonale F-10-Antikörper verwendet und die Biopsien für die IF in Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Diese Methode zeigte in Hoden mit obstruktiver Azoospermie eine Färbung im Zytoplasma von Leydig-Zellen und in Kernen spermatogener Zellen, die nicht weiter charakterisiert wurden. In Hoden mit Reifungsstörungen zeigte sich eine insgesamt schwächere Färbung und in Hoden mit sco eine als signifikant erhöht beschriebene Färbung in den Leydig-Zellen. Die IF-Bilder gaben außerdem Hinweise darauf, dass eine Färbung in Kernen von Sertoli-Zellen vorlag, welche allerdings in Hoden mit sco fehlte. Mittels Western Blot-Analyse konnte in allen drei Proben das Protein mit einem Molekulargewicht von 66 kDa nachgewiesen werden. Dabei wurde von einer deutlich schwächer ausgeprägten Bande der sco-Probe auf eine verminderte Expression des Rezeptors in Hoden mit sco geschlossen. Ein Nachweis des Rezeptors auf mRNA-Ebene fehlte. In der eigenen Arbeit konnte mit Hilfe des F-10-Antikörpers keine Färbung im Zytoplasma von Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis des Rezeptorproteins in Kernen von Keimzellen stimmte allerdings mit den Ergebnissen von Han et al. (2009) überein. In vorliegender Arbeit wurde die Immunoblot-Analyse lediglich an Hodenhomogenat von Patienten mit nsp vorgenommen und nicht wie bei Han et al. (2009) beschrieben auch an Homogenat von Patienten mit sco. Die Lokalisation des Rezeptors in sco-Tubuli konnte

allerdings sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene ausgeschlossen werden und deckte sich nicht mit oben genannten Ergebnissen.

Cavaco et al. (2009) wiesen den Rezeptor sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene nach. Sie verwendeten Hodengewebe von 10 infertilen Patienten im Alter von 29 bis 48 Jahren. Für die IHC wurde Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet. Außerdem kam ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen zum Einsatz. Das Protein konnte in Sertoli- und Leydig-Zellen sowie in allen Keimzellstadien nachgewiesen werden. Die RT-PCR bestätigte das Vorkommen der Rezeptor-mRNA in Hodengewebe, wobei in Gewebe mit unterschiedlichen Diagnosen (sco, hyp, sza und sekundär obstruktive Azoospermie) auch jeweils die Expression des Rezeptors nachweisbar war. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit zeigten bei Cavaco et al. (2009) auch die Sertoli-Zellen eine positive Färbung für das ER $\alpha$ -Protein, was sich wiederum mit Ergebnissen von Han et al. (2009) deckte.

Filipiak et al. (2012) wiesen den Rezeptor lediglich auf Protein-Ebene mittels IHC nach. Sie verwendeten Hodengewebe von Patienten mit normaler Spermatogenese, welches Bouin-fixiert und in Paraffin eingebettet war. Es kam dabei ein monoklonaler Antikörper aus der Maus zum Einsatz (N 1575 von DAKO). Das Protein konnte im Zytoplasma von Sertoli- und Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei Taylor und Al-Azzawi (2000), wobei eine nukleäre Färbung vorlag. Andere Arbeiten (Han et al., 2009; Cavaco et al., 2009) wiesen den Rezeptor unter anderem ebenfalls in Sertoli- und Leydig-Zellen nach. In vorliegender Arbeit zeigte sich auch eine zytoplasmatische Lokalisation des ER $\alpha$  in Leydig-Zellen (IHC HC-20-Antikörper) und konnte auf mRNA-Ebene mittels RT-Nested-PCR bestätigt werden. Keiner der beiden getesteten Antikörper zeigte jedoch ein immunopositives Signal in Sertoli-Zellen, was die ISH auf mRNA-Ebene bestätigte. Die Bande der RT-PCR von Hodenhomogenat mit sco und die geringe quantitative Expression des ER $\alpha$  in sco kann einerseits durch einzelne ER $\alpha$ -positive Leydigzellen und andererseits durch einen nicht 100 % monomorphen Schnitt erklärt werden. Denn mittels UV-LAM von Tubuli mit reinem sco und anschließender RT-PCR konnte der Nachweis von ER $\alpha$ -mRNA in Sertoli-Zellen eindeutig ausgeschlossen werden.

Über die Lokalisation im Hoden hinaus geht der Nachweis des ER $\alpha$  in immaturren Keimzellen und Spermatozoen aus Samenproben gesunder Männer (Durkee et al., 1998; Aquila et al., 2004; Lambard et al., 2004; Solakidi et al., 2005; Lambard und Carreau, 2005). Hierbei konnten Durkee et al., (1998) und Aquila et al., (2004) den Östrogenrezeptor im Schwanzteil der Spermatozoen nachweisen und mittels Western Blot-Analyse eine Bande von 65 bzw. 67

kDa darstellen. Lambard et al. (2004) und Solakidi et al. (2005) fanden mittels Western Blot-Analyse nicht nur eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 66 kDa, sondern auch zusätzlich eine weitere mit einem Molekulargewicht von 46 bzw. 45 kDa. Han et al. (2009) konnten mit dem F-10-Antikörper nur eine 66 kDa-Variante in Hodenhomogenat nachweisen. Der Nachweis beider Isoformen in Hodengewebe gelang in vorliegender Arbeit lediglich unter Verwendung des F-10-Antikörpers. In MCF-7- bzw. T47D-Zellen war neben dem F-10-Antikörper auch der HC-20-Antikörper fähig, beide Isoformen nachzuweisen. Die Arbeitsgruppe um Flouriot et al. (2000) konnte durch Versuche mit MCF7-Zellen zeigen, dass der 46 kDa-Isoform die aminoternale A/B-Domäne und demzufolge die Aktivierungsfunktion 1 (AF1) fehlt. Die leichte Variante wird in Zellen, die hauptsächlich die AF1 nutzen, als starker Inhibitor der 66 kDa-Variante angesehen.

Der Nachweis des ER $\alpha$  auf Proteinebene gestaltete sich schwierig und wurde von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Daher ist es möglich, dass es zu unterschiedlichsten Ergebnissen der Lokalisation des Rezeptors kommt. Die Wahl der Methode (IHC, Immunofluoreszenz, Immunopräzipitation, Immunoblot) sollte sich nach den Vorgaben der Antikörperdatenblätter richten und das verwendete Gewebe sollte ebenfalls für den entsprechenden Antikörper geeignet sein. Dabei besteht die Möglichkeit unterschiedlich fixiertes Gewebe (Bouin, Formalin) oder Frischgewebe zu verwenden (Quetschpräparate, Kryoschnitte). Zudem spielt bei der IHC die Art der Visualisierung (APAAP oder ABC) eine Rolle. Außerdem bestehen Unterschiede in den Antikörperepitopen und -verdünnungen. Zur Überprüfung der Funktionalität sollte zudem eine Positivkontrolle durchgeführt werden. Für den Nachweis des ER $\alpha$  eignen sich MCF7- und T47D-Zellen. Sie gehören zu Brustkrebs-Zelllinien, die als Östrogenrezeptor-positive Zelllinien bekannt sind. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Ductuli efferentes-Gewebe, welches nachweislich ER $\alpha$ -positiv ist (Saunders et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl mit Brustkrebs-Zelllinien (IB), als auch mit Hodenpräparaten, die Anschnitte von Ductuli efferentes aufwiesen (IHC), gearbeitet. Trotz funktionierender Positivkontrollen zeigten sich im Hodengewebe unterschiedliche Ergebnisse (HC-20- und F-10-Antikörper) oder aber es konnte kein Rezeptorprotein detektiert werden (H-184, 1F3, 1D5 und 60C).

Die Ergebnisse, die mittels HC-20-Antikörper erzielt wurden, sind folgendermaßen zu betrachten: Die Funktionalität dieses Antikörpers konnte mittels IHC an Referenzschnitten mit Ductuli efferentes bestätigt werden, im Hoden wurde das Kernprotein allerdings im Zytoplasma nachgewiesen. Die zytoplasmatische Färbung der Leydig-Zellen konnte jedoch



mittels RT-Nested-PCR und die zytoplasmatische Färbung der Spermatogonien mittels RT-PCR von immunopositiven TIN-Schnitten bestätigt werden. Zudem zeigte sich bei der RT-qPCR von sga eine relativ hohe Expression im Vergleich zu sco. Außerdem findet sich in der Literatur ebenfalls teilweise eine zytoplasmatische Lokalisation des ER $\alpha$ -Rezeptors (Pentikäinen et al., 2000; Han et al., 2009; Filipiak et al., 2012). Diese könnte möglicherweise auf den membranständigen GPER hinweisen. Hierbei bleibt zu klären, ob die beiden unterschiedlichen Rezeptoren gleiche Epitope aufweisen, an die der Antikörper binden kann. Die Funktionalität des HC-20-Antikörpers konnte ein weiteres Mal mittels IB an Brustkrebs-Zelllinien bewiesen werden. Möglicherweise ist die Detektion mittels IB im Hoden durch sehr geringe Mengen des Proteins erschwert. Wir konnten zeigen, dass in MCF-7-Zellen zwei deutliche Banden detektiert wurden, die im Hodengewebe sehr schwach waren (F-10-Antikörper) oder fehlten (HC-20-Antikörper). Dieses Bild spiegelt sich auf mRNA-Ebene wieder, wo die Expression von ER $\alpha$  in MCF-7-Zellen signifikant höher war als in Hoden mit nsp.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal das quantitative Expressionsmuster des ER $\alpha$  im menschlichen Hoden und bei unterschiedlichen Spermatogenesestörungen im Vergleich zur normalen Spermatogenese untersucht. Die ER $\alpha$ -mRNA-Expression in Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese war hierbei signifikant höher, als in Proben mit Spermatogenesestörungen. Mittels RT-PCR und RT-qPCR konnte eine Expression der ER $\alpha$ -mRNA in Biopsien mit sco nachgewiesen werden. Diese positive Reaktion ist jedoch kein Hinweis auf eine ER $\alpha$ -Expression in Sertoli-Zellen, sondern weist auf vereinzelte Leydigzellen, die mittels RT-Nested-PCR als ER $\alpha$ -positiv nachgewiesen wurden, hin. Zudem ist es möglich, dass eine als monomorph beurteilte Biopsie vereinzelt Tubuli mit anderen histologischen Diagnosen aufweist. Dies bestätigte sich mittels qualitativer RT-PCR nach UV-LAM, wo sowohl das Interstitium, als auch die Tubuli mit sco keine spezifische Bande produzierten. Zusätzlich wurden die quantitative Expression des ER $\alpha$ , des ER $\beta$ , sowie des membranassoziierten GPER im Vergleich untersucht. Dabei zeigte sich, dass die ER $\alpha$ -Expression in MCF-7-Zellen signifikant höher war, als in Hodengewebe. Die Expression des ER $\beta$  und des GPER in Hodengewebe war deutlich höher als die des ER $\alpha$ , wobei sich bei Betrachtung der unterschiedlichen Diagnosen lediglich für ER $\beta$  eine Signifikanz zwischen nsp und sza zeigte. Die ER $\beta$ - und GPER-Expressionen in MCF-7-Zellen waren deutlich niedriger als in Hodengewebe.

Bei Betrachtung des quantitativen Expressionsmusters des ER $\alpha$  und der mitotischen Aktivität der Spermatogonien bei unterschiedlichen histologischen Diagnosen nebeneinander, fällt auf, dass mit abnehmender Fertilität nicht nur die quantitative Expression des Rezeptors, sondern auch die mitotische Aktivität herabgesetzt war.

Die Effektivität der Spermatogenese ist unter anderem abhängig von der Proliferationsrate der Spermatogonien, welche als Stammzellen der Keimzellbildung für die Analyse von Spermatogenesestörungen besonders interessant sind. Zur Beurteilung der mitotischen Aktivität der Spermatogonien wurde mittels IHC das Proliferationsprotein Ki-67 detektiert. Die anschließende Bestimmung immunopositiver Spermatogonien pro Tubulus seminiferus zeigte, dass die Anzahl proliferierender Zellen in Keimtubuli mit normaler Spermatogenese signifikant höher ( $p < 0,05$ ) war, als in Keimtubuli mit Hypospermatogenese oder spermatogenetischen Arresten. Steger et al. (1998) führten ähnliche Versuche mit gleichartigen Ergebnissen durch. Neben dem Nachweis des Ki-67-Proteins erfolgte dort zusätzlich eine IHC für das Proliferationsprotein PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Dieses Protein wurde allerdings nicht nur in Kernen mitotisch aktiver Spermatogonien, sondern zusätzlich in primären Spermatozyten nachgewiesen und zeigte so insgesamt einen höheren Prozentsatz immunopositiver Zellen als Ki-67. Diese Tatsache ist auf seine Beteiligung an Nukleotid-Reparaturmechanismen und seine längere Halbwertszeit zurückzuführen. Bar-Shira Maymon et al. (2003) führten ähnliche Versuche wie Steger et al. (1998) mit PCNA durch. Auch hier zeigte sich, dass eine signifikante Reduktion PCNA-positiver Spermatogonien in Tubuli seminiferi mit Spermatozytenarrest im Vergleich zu Tubuli seminiferi mit normaler Spermatogenese vorlag. Allerdings war die PCNA-Expression in Tubuli mit einer vollständigen Reifungshemmung signifikant höher, als in Tubuli mit Spermatozytenarrest. Eine weitere Arbeitsgruppe um Takagi (2001) untersuchte das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose. Die Zellproliferationsrate von Spermatogonien, welche ebenfalls auf dem Nachweis des PCNA beruhte, zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen fertilen und infertilen Patienten. Allerdings war die Apoptose-Rate bei Patienten einer infertilen Gruppe signifikant erhöht, wenn sie mit fertilen Patienten der Kontrollgruppe verglichen wurden. Zudem war das Verhältnis zwischen der PCNA-positiven-Rate und der Apoptose-Rate bei infertilen Patienten signifikant höher, als bei fertilen Patienten. Eine beschleunigte Apoptose wurde von dieser Arbeitsgruppe eher für eine verminderte Anzahl der Spermatogonien verantwortlich gemacht, als eine herabgesetzte Proliferation dieser Zellen.

Eine Unterscheidung der mitotischen Aktivität bei Typ A- und Typ B-Spermatogonien, für unterschiedliche Spermatogenesestadien, sowie für verschiedene score-Werte (siehe Steger et al., 1998) wurde in vorliegender Arbeit nicht vorgenommen, da es primär um den Zusammenhang zwischen dem gemessenen Serum-Östradiol-Wert und der mitotischen Aktivität bei normaler oder gestörter Spermatogenese, ging. Es stellte sich die Frage, ob der Serum-Östradiol-Wert als Marker für Infertilität Verwendung finden kann bzw. auf ein bestimmtes histologisches Erscheinungsbild hinweist. Versuche an verschiedenen Tiermodellen zeigten, dass Östrogene bei der Differenzierung und Proliferation von Spermatogonien eine wichtige Rolle spielen (D'Istria et al., 2003; Wagner et al., 2006; Li et al., 2007; Porter et al., 2009; Review von Loveland, 2011). D'Istria et al. (2003) nutzten in ihrer Studie an den Fröschen *Rana esculenta* den positiven Effekt von Östradiol auf die Proliferation der Spermatogonien (Minucci et al., 1997), um den anti-proliferativen Effekt von Melatonin auf die Spermatogenese zu verifizieren. Wagner et al. (2006) zeigten, dass gegen GnRH immunisierte Eber eine geringere Östradiolkonzentration im peripheren Blut (Basiswerte), eine um 60 % verminderte Zahl spermatogenetischer Zellen (außer Typ A-Spermatogonien), sowie eine um bis zu 50 % reduzierte Mitoserate aufwiesen. Nach Östradiolinfusion, konnte die Zahl der spermatogenetischen Zellen wieder erhöht und die Mitose der Zellen teilweise wieder hergestellt werden. Li et al. (2007) untersuchten den Einfluss von exogenem Östradiol auf die Proliferation von Keimzellen bei kryptorchiden Mäusen. Es zeigte sich, dass ein positiver Effekt auf die Keimzellen (erst) ab einer Dosis von 0,5 µg Östradiol pro Gramm Körpergewicht zu verzeichnen war. Porter et al. (2009) konnten mit Versuchen an bestrahlten Ratten zeigen, dass Östradiol eine direkte positive Wirkung auf die Differenzierung der Spermatogonien hat.

Zwischen den morphometrischen Befunden der einzelnen Patienten und dem peripheren Östradiol-Wert zeigte sich jedoch keine Korrelation (Korrelationskoeffizient: -0,150). Die Serum-Östradiol-Werte der untersuchten Patienten lagen mit 39 - 112 pmol/l in der Norm. Zu bedenken ist, dass sich der periphere Östradiol-Wert hauptsächlich aus der Aromatisierung ergibt, die im gesamten Körper stattfindet und z.B. von Alter und Körpermasse abhängig ist (Lakshman et al., 2010). Dieser Wert spiegelte demnach nicht die hormonelle Situation direkt im Hoden wieder. Zudem zeigten Bujan et al. (1993), dass sich im Blut gemessene Östradiol-Werte bei fertilen Patienten im Vergleich zu infertilen Patienten nicht signifikant voneinander unterschieden. Arbeiten, bei denen der Östradiol-Wert im Ejakulat gemessen wurde, zeigten, dass Männer mit Fruchtbarkeitsproblemen (oligozoosperm, azoosperm) signifikant höhere Östradiol-Werte im Ejakulat aufwiesen, als Männer der fertilen Kontrollgruppe (Bujan et al.,

1993; Luboshitzky et al., 2002; Zhang et al., 2010). Die Arbeitsgruppe um Zhang (2010) verglich neben den Östradiol-Werten im Ejakulat auch die Testosteron-Werte im Ejakulat sowie das Verhältnis zwischen Testosteron und Östradiol. Sie schrieben einem normalen Testosteron-/Östradiol-Verhältnis eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Spermatogenese zu und vermuteten, dass eine Verminderung dieses Verhältnisses als Indikator für eine fehlende Spermaproduktion bei Patienten mit nicht-obstruktiver Azoospermie fungieren kann.

Diese Arbeit hatte das Ziel, das konfuse Bild aus der Literatur über die Lokalisation des ER $\alpha$  im humanen Hoden zu klären. Zum ersten Mal wurden insgesamt sechs verschiedene Antikörper getestet und die dort erzielten Ergebnisse unter anderem mit der besonderen Technik der LACP und anschließender RT-PCR auf mRNA-Ebene bestätigt. Es zeigte sich, dass zwei der getesteten Antikörper immunopositive Signale in Keimzellen detektierten und der F-10-Antikörper sensitiv genug war, um im IB das Rezeptorprotein nachzuweisen. Auf mRNA-Ebene bestätigte sich die Expression des Rezeptors in Keimzellen. Außerdem nahm die quantitative Expression des ER $\alpha$  mit gravierenderer Spermatogenesestörung ab.

Zwischen dem peripheren Östradiol-Wert und der mitotischen Aktivität der Spermatogonien bestand kein Zusammenhang. Daher kann der gemessene Hormonwert nicht als Marker für die Fertilität eines Mannes verwendet werden.

Weiterführende Untersuchungen werden klären, wo die Östrogen-Bindungsstellen in Hodenzellen liegen. Zudem soll die leichtere 46 kDa-Variante des ER $\alpha$  genauer charakterisiert und die genomische Sequenz des Rezeptors und anderer bekannter mit Fertilität in Verbindung stehender Gene von infertilen Männern untersucht werden. Schließlich bleibt die Klärung der Lokalisation und Expression des ER $\beta$  und des membranassoziierten GPER auf Protein- und mRNA-Ebene mittels IHC, IB-Analyse und ISH.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit sollten die Lokalisation und Expression des Östrogenrezeptors alpha, seine quantitative Expression im Hoden mit normaler oder gestörter Spermatogenese und ein Zusammenhang zwischen dem gemessenen peripheren Östrogenwert und der mitotischen Aktivität der Spermatogonien bei unterschiedlichen histologischen Diagnosen untersucht werden.

In der Literatur sind sehr unterschiedliche Ergebnisse über die Lokalisation des ER $\alpha$  im menschlichen Hoden zu finden. Die meisten Arbeiten beschränken sich dabei auf einen Nachweis des Rezeptors auf Protein-Ebene. Daher wurde in vorliegender Arbeit die Lokalisation auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Der Nachweis auf Proteinebene erfolgte mittels IHC und IB-Analyse, der Nachweis auf mRNA-Ebene mittels ISH und RT-PCR. Durch die Technik der UV-LAM konnten bei letzterer Methode zusätzlich einzelne Zellkompartimente isoliert gewonnen und auf die Expression des Rezeptors untersucht werden.

Die Literatur gibt auch unterschiedliche Ansätze und Theorien über den Einfluss von Östrogenen auf die männliche Fertilität wider. Daher stellte sich hier die Frage, ob beim Menschen ein Zusammenhang zwischen der mitotischen Aktivität der Spermatogonien und dem peripheren Östrogenwert besteht, und ob sich die quantitative Expression des Rezeptors mit abnehmender Qualität der Spermatogenese bis hin zu einem völligen Keimzellarrest in Form des sco signifikant verändert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Der ER $\alpha$  war mittels zweier Antikörper (HC-20, F-10) in verschiedenen Zelltypen und auch in unterschiedlichen Zellkompartimenten nachweisbar. Die Funktionalität aller sechs Antikörper zeigte sich durch den Nachweis des Rezeptors in Kernen von Ductuli efferentes-Epithelzellen.
- 2) Mittels IB-Analyse unter Verwendung des F-10-Antikörpers wurden in Hodengewebe sowie MCF-7- und T47D-Zellen zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 66 und 46 kDa nachgewiesen. Unter Verwendung des HC-20-Antikörpers konnten lediglich in MCF-7- und T47D-Zellen beide spezifische Banden nachgewiesen

werden. Bei der leichteren Bande handelt es sich um eine Isoform, der die aminoterminal A/B-Domäne fehlt.

- 3) Mittels ISH war der Rezeptor in Spermatogonien, primären Spermatozyten sowie vereinzelt in Leydig-Zellen nachweisbar.
- 4) Die RT-PCR nach UV-LAM bestätigte das Vorkommen der Rezeptor-mRNA in Keimzellen.
- 5) Die Expression des ER $\alpha$  wurde mit abnehmender Qualität der Spermatogenese weniger.
- 6) Die Expression des ER $\beta$  und des GPER waren im Hoden deutlich höher als die des ER $\alpha$ . Die Expression des ER $\alpha$  war in MCF-7-Zellen signifikant höher als im Hoden.
- 7) Die mitotische Aktivität war in Tubuli mit normaler Spermatogenese signifikant höher, als in Tubuli mit gestörter Spermatogenese. Es bestand kein Zusammenhang zwischen dem peripheren Östrogenwert und der mitotischen Aktivität der Spermatogonien.

Weitere Untersuchungen sollen folgendes klären:

- 1) spezifische Östrogen-Bindungsstellen in Hodenzellen mittels Steroid-Autoradiographie,
- 2) den Charakter der 46 kDa-Isoform mittels UV-LAM und RT-PCR inklusive der Sequenzierung der PCR-Produkte,
- 3) die genomische Sequenz des ER $\alpha$  und anderer bekannter mit Fertilität in Verbindung stehender Gene von infertilen Männern mittels genomischem ‚target enrichment‘ und
- 4) das Expressionsmuster des ER $\beta$  und des membranassoziierten GPER auf Protein- und mRNA-Ebene mittels IHC, IB und ISH.

## 7 Summary

The aim of this doctoral thesis was to examine the localization and expression of ER $\alpha$ , its quantitative expression in the testes of patients with normal or impaired spermatogenesis and whether there is a correlation between the estrogen level in peripheral blood and mitotic activity of spermatogonia in biopsies with different histological diagnoses.

In the literature, quite different results are reported regarding the localization of ER $\alpha$  in the human testis. The majority of studies, however, are restricted to the detection of the receptor at the protein level. This is why the present study investigated the localization at the protein as well as at the mRNA level. The first was determined by immunohistochemistry and immunoblot analysis, the second by *in situ* hybridization and RT-PCR. Using UV-LACP, it was possible to isolate individual cell compartments and to analyze the expression of the receptor in that tissue.

In the literature, there are also numerous approaches and theories on the influence of estrogens on male fertility. We thus posed the question whether there is a correlation between mitotic activity of spermatogonia and peripheral estrogen level as well as a significant change in the quantitative expression of the receptor with decreasing quality of spermatogenesis - culminating in the complete absence of germ cells (sco).

The results of the present study can be summarized as follows:

- 1) ER $\alpha$  was detected in different cell types and in various cell compartments using two different antibodies (HC-20, F-10). The functionality of all of the six antibodies used was shown by the detection of the receptor in the nuclei of epithelial cells of the ductuli efferentes.
- 2) IB analysis using the F-10 antibody showed the presence of two bands with a molecular weight of 66 and 46 kDa in testis homogenate and MCF-7 and T47D cells. Using the HC-20 antibody, the detection of the two specific bands was only possible in MCF-7 and T47D cells. The lighter band represents an isoform that lacks the amino-terminal A/B domain.
- 3) Using *in situ* hybridization, the receptor could be detected in spermatogonia, primary spermatocytes and occasionally in Leydig cells.
- 4) RT-PCR after UV-LACP confirmed the presence of the receptor mRNA in germ cells.

- 5) The expression of ER $\alpha$  decreased with decreasing quality of spermatogenesis.
- 6) The expression of ER $\beta$  and of GPER in the testes was clearly higher than the expression of ER $\alpha$ . The expression of ER $\alpha$  in MCF-7 cells was significantly higher than in the testes.
- 7) Mitotic activity of spermatogonia was significantly higher in tubules with normal spermatogenesis than in tubules with impaired spermatogenesis. There was no correlation between peripheral estrogen level and mitotic activity of spermatogonia.

The following points need to be elucidated in further experiments:

- 1) specific estrogen-binding sites in testicular cells using steroid autoradiography,
- 2) the nature of the 46-kDa isoform using UV-LACP and RT-PCR including sequencing of PCR products,
- 3) the genomic sequences of ER $\alpha$  and other genes known to affect male fertility using genomic target enrichment and
- 4) the expression patterns of ER $\beta$  and membrane-associated GPER at the level of protein and mRNA using IHC, immunoblot analysis and *in situ* hybridization.



## 8 Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004a) Zellkommunikation. In: Molekularbiologie der Zelle, Übersetzung herausgegeben von L Jaenicke, 4. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 967-1054.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004b) Zellzyklus und programmierter Zelltod. In: Molekularbiologie der Zelle, Übersetzung herausgegeben von L Jaenicke, 4. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1141-1193.

Andersson SO, Adami HO, Bergström R, Wide L (1993) Serum pituitary and sex steroid hormone levels in the etiology of prostatic cancer - a population-based case-control study. *Br J Cancer* 68, 97-102.

Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A, Rago V, Andò S (2004) Estrogen receptor (ER) alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1443-1451.

Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Yavetz H, Lifschitz-Mercer B, Schreiber L, Kleiman SE, Botchan A, Hauser R, Paz G (2003) Spermatogonial proliferation patterns in men with azoospermia of different etiologies. *Fertil Steril* 80, 1175-1180.

Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6, 225-236.

Beckstead JH (1983) Alkaline phosphatase histochemistry in human germ cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 7, 341-349.

Bergmann M (2006) Physiology of Spermatogenesis. In: *Andrology for the Clinician*. Schill W-B, Comhaire FH, Hargreave TB (eds), Springer Verlag Berlin, 272-280.

Bergmann M, Kliesch S (2010) Testicular Biopsy and Histology. In: Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hrsg.), Springer Verlag Heidelberg, 155-168.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Brodie A, Inkster S, Yue W (2001) Aromatase expression in the human male. *Mol Cell Endocrinol* 178, 23-28.

Bujan L, Mieusset R, Audran F, Lumbroso S, Sultan C (1993) Increased oestradiol level in seminal plasma in infertile men. *Hum Reprod* 8, 74-77.

Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER (1997) Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 337, 91-95.

Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C (2011) Estrogens: new players in spermatogenesis. *Reprod Biol* 11, 174-193.

Carreau S, de Vienne C, Galeraud-Deni I (2008) Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Adv Med Sci* 53, 139-144.

Carreau S, Hess RA (2010) Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 1517-1535.

Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S (2003) Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 35-43.

Carreau S, Silandre D, Bourguiba S, Hamden K, Said L, Lambard S, Galeraud-Denis I, Delalande C (2007) Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz J Med Biol Res* 40, 761-768.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168, 357-363.

Cavaco JE, Laurentino SS, Barros A, Sousa M, Socorro S (2009) Estrogen receptors alpha and beta in human testis: both isoforms are expressed. *Syst Biol Reprod Med* 55, 137-144.

Chen M, Hsu I, Wolfe A, Radovick S, Huang K, Yu S, Chang C, Messing EM, Yeh S (2009) Defects of prostate development and reproductive system in the estrogen receptor-alpha null male mice. *Endocrinology* 150, 251-259.

Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269: 28314-28322.

Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112, 35-51.

Del Castillo EB, Trabucco A, De la Balze FA (1947) Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells. *J Clin Endocrinol Metab* 7, 493-502.

Deroo BJ, Korach KS (2006) Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116, 561-570.

D'Istria M, Palmiero C, Serino I, Izzo G, Minucci S (2003) Inhibition of the basal and oestradiol-stimulated mitotic activity of primary spermatogonia by melatonin in the testis of the frog, *Rana esculenta*, in vivo and in vitro. *Reproduction* 126, 83-90.

Dong L, Wang H, Su Z, Niu S, Wang R, Wu L, Chen G (2011) Steroidogenic acute regulatory protein is a useful marker for Leydig cells and sex-cord stromal tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 19, 226-232.

Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (Eralpha) and beta (Erbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277-4291.

Durkee TJ, Mueller M, Zinaman M (1998) Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Am J Obstet Gynecol* 178, 1288-1297.

Dym M, Fawcett D (1971) Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* 4, 195-215.

Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS (1996) Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796-4805.

Edwards DP (2005) Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67, 335-376.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA (1997) Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-4265.

Fawcett D, Leak L, Heidger P (1970) Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J Reprod Fertil Suppl* 10, 105-122.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14, 1649-1660.

Filipiak E, Suliborska D, Laszczynska M, Walczak-Jedrzejowska R, Oszukowska E, Marchlewska K, Kula K, Słowikowska-Hilczer J (2012) Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 50, 340-345.

Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM (1997) Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinol* 153, 485-495.

Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F (2000) Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J* 19, 4688-4700.

Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ (1996) Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 88, 1118-1126.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991) Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138, 867-873.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710-1715.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20.

Gosden JR, Middleton PG, Rout D (1986) Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24-q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 43, 218-220.

Gower DB (1988) The biosynthesis of steroid hormones: an up-date, In: *Hormones and their actions Part I*. Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ (Hrsg.), Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 3-28.

Green S (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.

Griswold MD (1998) The central role of sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9, 411-416.

Hall PA, Levison DA (1990) Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 43, 184-192.

Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP (1993) High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 8, 203-207.

Hammes SR, Levin ER (2007) Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 28, 726-741.

Han Y, Feng HL, Sandlow JI, Haines CJ (2009) Comparing expression of progesterone and estrogen receptors in testicular tissue from men with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J Androl* 30, 127-133.

Hendry WF, Parslow JM, Stedronska J (1983) Exploratory scrototomy in 168 azoospermic males. *Br J Urol* 55, 785-791.

Herrmann BL, Saller B, Janssen OE, Gocke P, Bockisch A, Sperling H, Mann K, Broecker M (2002) Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5476-5484.

Hess RA (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 52-65.

Hess RA, Fernandes SA, Gomes GR, Oliveira CA, Lazari MF, Porto CS (2011) Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *J Androl* 32, 600-613.

Hill P, Wynder EL, Garbaczewski L, Walker AR (1982) Effect of diet on plasma and urinary hormones in South African black men with prostatic cancer. *Cancer Res* 42, 3864-3869.

Holstein AF (2008) Männliche Geschlechtsorgane. In: Anatomie Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Drenckhahn D (Hrsg.), Urban & Fischer Verlag, München: 799-838.

Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S (1998) Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 445-449.

Jayle MF, Scholler R, Sfikakis A, Heron M (1962) Excretion of phenol steroids and 17-ketosteroids after administration of chorionic gonadotropins to men. *Clin Chim Acta* 7, 212-220.

Key G, Becker MH, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J (1993) New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 68, 629-636.

Koskimies A, Korman M, Alfthan O (1973) Proteins of the seminiferous tubule fluid in man - evidence for a blood-testis barrier. *J Reprod Fertil* 32, 79-86.

Kubbutat, MHG, Cattoretti G, Gerdes J, Key G (1994) Comparison of monoclonal antibodies PC10 and MIN1 on microwave-processed paraffin sections. *Cell Prolif* 27, 553-559.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925-5930.

Lakshman KM, Kaplan B, Travison TG, Basaria S, Knapp PE, Singh AB, LaValley MP, Mazer NA, Bhasin S (2010) The effects of injected testosterone dose and age on the conversion of testosterone to estradiol and dihydrotestosterone in young and older men. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 3955-3964.

Lambard S, Carreau S (2005) Aromatase and oestrogens in human male germ cells. *Int J Androl* 28, 254-259.

Lambard S, Galeraud-Denis I, Saunders PT, Carreau S (2004) Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *J Mol Endocrinol* 32, 279-289.

Li EZ, Li DX, Zhang SQ, Wang CY, Zhang XM, Lu JY, Duan CM, Yang XZ, Feng LX (2007) 17beta-estradiol stimulates proliferation of spermatogonia in experimental cryptorchid mice. *Asian J Androl* 9, 659-667.

Loveland KL (2011) Defining the impact of estrogen on spermatogonial fate. *Biol Reprod* 85, 647-649.

Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11162-11166.

Luboshitzky R, Kaplan-Zverling M, Shen-Orr Z, Nave R, Herer P (2002) Seminal plasma androgen/oestrogen balance in infertile men. *Int J Androl* 25, 345-351.

Mäkinen S, Mäkelä S, Weihua Z, Warner M, Rosenlund B, Salmi S, Hovatta O, Gustafsson JA (2001) Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Mol Hum Reprod* 7, 497-503.

Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P (2006) Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 7, 497-508.

Meyer U (2004) Die Geschichte der Östrogene. *Pharm. Unserer Zeit* 5, 352-356.

Minucci S, Di Matteo L, Chieffi P, Pierantoni R, Fasano S (1997) 17 beta-estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool* 278, 93-100.

Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Home EL, Su JL, Klierer SA, Lehmann JM, Willson TM (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 75-78.



Morishima A, Grmbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K (1995) Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3689-3698.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49-53.

Muller RE, Johnston TC, Traish AM, Wotiz HH (1979) Studies on the mechanism of estradiol uptake by rat uterine cells and on estradiol binding to uterine plasma membranes. *Adv Exp Med Biol* 117, 401-421.

Nagata C, Takatsuka N, Shimizu H, Hayashi H, Akamatsu T, Murase K (2001) Effect of soymilk consumption on serum estrogen and androgen concentrations in Japanese men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 179-184.

Nieschlag E, Behre HM, Wieacker P, Meschede D, Kamischke A, Kliesch S (2010) Disorders at the Testicular Level. In: *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hrsg.), Springer Verlag Heidelberg, 193-238.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 3, 289-318.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors Eralpha and Erbeta at AP1 sites. *Science* 277, 1508-1510.

Payne AH, Kelch RP, Musich SS, Halpern ME (1976) Intratesticular site of aromatization in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 6, 1081-1087.

Pelletier G, El-Alfy M (2000) Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4835-4840.

Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L (2000) Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2057-2067.

Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 11, 1486-1496.

Pink JJ, Wu SQ, Wolf DM, Bilimoria MM, Jordan VC (1996) A novel 80 kDa human estrogen receptor containing a duplication of exons 6 and 7. *Nucl Acids Res* 24, 962-969.

Porter KL, Shetty G, Shuttlesworth GA, Wenig CC, Huhtaniemi I, Pakarinen P, Meistrich ML (2009) Estrogen enhances recovery from radiation-induced spermatogonia arrest in rat testes. *J Androl* 30, 440-451.

Prossnitz ER, Barton M (2011) The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 7, 715-726.

Rago V, Bilinska B, Palma A, Andò S, Carpino A (2003) Evidence of aromatase localization in cytoplasmic droplet of human immature ejaculated spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol* 41, 23-27.

Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7986-7991.

Rochira V, Balestrieri A, Madeo B, Spaggiari A, Carani C (2002) Congenital estrogen deficiency in men: a new syndrome with different phenotypes; clinical and therapeutic implications in men. *Mol Cell Endocrinol* 193, 19-28.

Rochira V, Balestrieri A, Madeo B, Zirilli L, Granata AR, Carani C (2006) Osteoporosis and male age-related hypogonadism: role of sex steroids on bone (patho)physiology. *Eur J Endocrinol* 154, 175-185.

Rochira V, Carani C (2009) Aromatase deficiency in men: a clinical perspective. *Nat Rev Endocrinol* 5, 559-568.

Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M (1987) The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 133, 579-584.

Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, Millar MR (2001) Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod* 7, 227-236.

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123, 513-522.

Schmoll HJ, Jordan K, Huddart R, Pes MP, Horwich A, Fizazi K, Kataja V, ESMO Guidelines Working Group (2010) Testicular seminoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21, 140-146.

Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-322.

Sierens JE, Sneddon SF, Collins F, Millar MR, Saunders PT (2005) Estrogens in testis biology. *Ann N Y Acad Sci* 1061, 65-76.

Sigg C (1979) Classification of tubular testicular atrophies in the diagnosis of sterility. Significance of the so-called 'bunte Atrophie'. *Schweiz Med Wochenschr* 109, 1284-1293.

Simoni M, Tüttelmann F, Gromoll J, Nieschlag E (2008) Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience. *Reprod Biomed Online* 16, 289-303.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 331, 1056-1061.

Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE (2005) Estrogen receptors alpha and beta (Eralpha and Erbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of Erbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 20, 3481-3487.

Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M (1998) The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 4, 227-233.

Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colón E, Svechnikova I, Söder O (2010) Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr* 73, 93-101.

Takagi S, Itoh N, Kimura M, Sasao T, Tsukamoto T (2001) Spermatogonial proliferation and apoptosis in hypospermatogenesis associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 76, 901-907.

Talvitie (2006) aus DELFIA immunoassays - Guide to Converting ELISA Assays to DELFIA, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finland.

Taylor AH, Al-Azzawi F (2000) Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 24, 145-155.

Toda K, Okada T, Takeda K, Akira S, Saibara T, Shiraishi M, Onishi S, Shizuta Y (2001) Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17beta-oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. *J Endocrinol* 168, 455-463.

Wagner A, Messe N, Bergmann M, Lekhkota O, Claus R (2006) Effects of estradiol infusion in GnRH immunized boars on spermatogenesis. *J Androl* 27, 880-889.

Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7889-7893.

Weinbauer G F, Luetjens C M, Simoni M, Nieschlag E (2010) Physiology of Testicular Function. In: Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hrsg.), Springer Verlag Heidelberg, 11-59.

[www.labor-lademannbogen.de](http://www.labor-lademannbogen.de), Analysen-Spektrum, Alphabetisches Analysenverzeichnis, Oestradiol im Serum (17- $\beta$ -Oestradiol, E2)

Yager JD, Chen JQ (2007) Mitochondrial estrogen receptors - new insights into specific functions. Trends Endocrinol Metab 18, 89-91.

Zhang Q, Bai Q, Yuan Y, Liu P, Qiao J (2010) Assessment of seminal estradiol and testosterone levels as predictors of human spermatogenesis. J Androl 31, 215-220.

Zhengwei Y, Wreford NB, Royce P, de Kretser DM, McLachlan RI (1998) Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment: heterogeneous pattern of spermatogenic impairment. J Clin Endocrinol Metab 83, 1284-1291.

Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA (2002) Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. J Androl 23, 870-881.

Zitzmann M, Faber S, Nieschlag E (2006) Association of specific symptoms and metabolic risks with serum testosterone in older men. J Clin Endocrinol Metab 91, 4335-4343.

Zondek B (1934) Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion. Nature 193, 209-210.

## 9 Anhang

### 9.1 Puffer, Nährböden und Lösungen

#### ABC

Menge	Reagenz	Anleitung
1 Tropfen	Lösung A	Lösungen mit 2,5 ml Waschpuffer vermischen und 30 min vor Gebrauch ansetzen
1 Tropfen	Lösung B	

#### AEC

Menge	Reagenz	Anleitung
1 Tropfen	AEC	beide Reagenzien miteinander vermischen
300 µl	Substratpuffer	

#### APES (2%iges 3-Aminopropyltriethoxysilan)

Menge	Reagenz	Anleitung
500 ml	Aceton	beide Reagenzien miteinander vermischen
10 ml	APES	

#### Blockpuffer I (IB)

Menge	Reagenz	Anleitung
1,5 g	Trockenmilchpulver	Trockenmilchpulver in PBS-Puffer auflösen
30 ml	0,1 M PBS-Puffer (pH 7,4)	
200 µl	Tween-20 (0,05 %)	Tween-20 hinzufügen und lösen

### Blockpuffer II (IB)

Menge	Reagenz	Anleitung
30 ml	0,1 M PBS-Puffer (pH 7,4)	PBS-Puffer mit Ziegenserum vermischen
1,5 ml	Ziegenserum	

### BSA-Blockpuffer (3%ig)

Menge	Reagenz	Anleitung
6 g	BSA	BSA in 1 x TNMT-Puffer lösen und Natriumazid hinzufügen
200 ml	1 x TNMT-Puffer	
einige Körner	Natriumazid	

### BSA-Blockpuffer (5%ig)

Menge	Reagenz	Anleitung
1 g	BSA	BSA in Puffer lösen
70 ml	1 x Triton-HCl-Puffer	

### Bouin'sche Lösung

Menge	Reagenz	Anleitung
15 ml	gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung	Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch miteinander vermischen
5 ml	37%iges Formalin	
1 ml	100%iger Eisessig	

### Citratpuffer

Menge	Reagenz	Anleitung
4,2 g (A)	Zitronensäure-Monohydrat	in 200 ml Aqua bidest lösen
29,41 g (B)	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	in 1 l Aqua bidest lösen
		7 ml Lösung A mit 41 ml Lösung B auf 500 ml Aqua dest auffüllen

### Denhardt-Reagenz (BFP)

Menge	Reagenz	Anleitung
200 mg	BSA (2%)	Reagenzien in DEPC-Wasser lösen
200 mg	Ficoll 400 (2%)	
200 mg	Polyvinylpyrrolidon (2%)	
10 ml	DEPC-Wasser	

### DEPC-Wasser

Menge	Reagenz	Anleitung
1 ml	DEPC	Reagenzien miteinander mischen und kräftig schütteln; Lösung über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubieren und anschließend autoklavieren
1 l	Aqua bidest	

### Dextransulfat (50% ig)

Menge	Reagenz	Anleitung
5 g	Dextransulfat	Reagenzien miteinander vermischen; einige Tage im Kühlschrank stehen lassen und anschließend mit DEPC-Wasser auf 10 ml auffüllen



### Essigsäure (20%ig)

Menge	Reagenz	Anleitung
160 ml	DEPC-Wasser	Reagenzien miteinander vermischen
40 ml	Eisessig	

### Glycerol (20%ig)

Menge	Reagenz	Anleitung
15 ml	Glycerol	Reagenzien mischen
60 ml	DEPC-Wasser	

### Glyzin-Lösung (0,2%ig)

Menge	Reagenz	Anleitung
200 mg	Glyzin	Glyzin in PBSM-Puffer lösen
100 ml	PBSM-Puffer	

### HCl-Lösung (0,2 N)

Menge	Reagenz	Anleitung
5,2 ml	konz. HCl (25%)	Reagenzien miteinander vermischen
200 ml	DEPC-Wasser	

### LB-Agar-Medium

Menge	Reagenz	Anleitung
40 Kapseln	LB-Agar-Medium	Kapseln in Aqua bidest lösen, anschließend autoklavieren und bei 4°C lagern
1 l	steriles Aqua bidest	

### LB-Medium

Menge	Reagenz	Anleitung
25 Kapseln	LB-Medium	Kapseln in Aqua bidest lösen, anschließend autoklavieren und bei 4°C lagern
1 l	steriles Aqua bidest	

### Levamisol-Lösung (1 M)

Menge	Reagenz	Anleitung
2,4 g	Levamisol	Levamisol in 1 x NTB-Puffer lösen
10 ml	1 x NTB-Puffer	

### Loading-Buffer für Agarosegele

Menge	Reagenz	Anleitung
0,25 ml	Bromphenolblau-Stammlösung	Reagenzien miteinander vermischen. Lösung anschließend filtrieren und aliquotieren.
0,25 ml	Xylencyanol-Stammlösung	
1,5 g	Ficoll 400	
1,5 ml	0,5 M EDTA	
10 ml	1 x TAE-Puffer	

### MgCl<sub>2</sub>-Lösung (1 M)

Menge	Reagenz	Anleitung
81,4 g	MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub> in DEPC-Wasser lösen
400 ml	DEPC-Wasser	

### NTB-Puffer (5 x)

Menge	Reagenz	Anleitung
60,5 g	Tris-HCl	Reagenzien in Aqua bidest lösen und auf einen pH-Wert von 9,6 einstellen; anschließend Zugabe von DEPC-Wasser; Lösung über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubieren und anschließend autoklavieren; vor Gebrauch 1 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung pro 500 ml 1 x NTB-Puffer hinzufügen
29,2 g	NaCl	
1 l	Aqua bidest	
1 ml	DEPC-Wasser	
25 ml	1 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung	

### Paraformaldehyd-Lösung (4%ig)

Menge	Reagenz	Anleitung
20 g	Paraformaldehyd	Paraformaldehyd in 1 x PBSM-Puffer bei 70°C lösen; konzentrierte NaOH hinzufügen, bis die Lösung klar wird; mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 7,0 einstellen
500 ml	1 x PBSM-Puffer	
	konzentrierte NaOH	
	konzentrierte HCl-Lösung	

### PBS-Puffer (0,1 M)

Menge	Reagenz	Anleitung
1 Tablette	PBS	Tablette in Aqua bidest auflösen und auf einen pH-Wert von 7,4 einstellen
200 ml	Aqua bidest	

### PBSM-Puffer (1 x)

Menge	Reagenz	Anleitung
2 Tabletten	PBS	PBS in DEPC-Wasser lösen und anschließend 1 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung hinzufügen
400 ml	DEPC-Wasser	
2 ml	1 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung	

### Proteinase K-Stammlösung

Menge	Reagenz	Anleitung
10 mg	Proteinase K	Reagenzien miteinander vermischen
1 ml	1 x PBSM-Puffer	

### RnaseA-/RnaseT1-Stammlösung

Menge	Reagenz	Anleitung
1 ml	2 x SSC-Puffer	Reagenzien miteinander vermischen (dies entspricht einer Endkonzentration von 300 µg/ml RnaseA und 10 U RnaseT1)
12 µl	RnaseA (25 mg/1 ml)	
0,1 µl	RnaseT1 (10 <sup>5</sup> U/1 ml)	

### SSC-Stammlösung (20 x)

Menge	Reagenz	Anleitung
88,23 g	Natriumcitrat	Reagenzien in Aqua bidest lösen und auf einen pH-Wert von 7,0 einstellen; anschließend Zugabe von DEPC-Wasser; Lösung über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubieren und anschließend autoklavieren
175,29 g	NaCl	
1 l	Aqua bidest	
1 ml	DEPC-Wasser	

### TAE-Puffer (10 x)

Menge	Reagenz	Anleitung
48,40 g	TRIZMA Base	beide Reagenzien bis auf 1 l Aqua bidest auffüllen, mischen und mit 100%iger Essigsäure auf einen pH-Wert von 8,0 einstellen
3,72 g	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (10 mM)	

### TAE-Puffer (1 x)

Menge	Reagenz	Anleitung
100 ml	10 x TAE-Puffer	beide Reagenzien miteinander vermischen
900 ml	Aqua bidest	

**TNMT-Puffer (10 x)**

Menge	Reagenz	Anleitung
121,1 g	Tris-HCl	Reagenzien in Aqua bidest lösen und auf einen pH-Wert von 7,5 einstellen; anschließend Zugabe von DEPC-Wasser; Lösung über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubieren und anschließend autoklavieren; nach dem Erkalten Triton-X-100 hinzufügen
58,4 g	NaCl	
4,17 g	MgCl <sub>2</sub>	
1 l	Aqua bidest	
1 ml	DEPC-Wasser	
5 ml	Triton-X-100	

**Tris-HCl-Puffer (10 x)**

Menge	Reagenz	Anleitung
121,1 g	Tris	beide Reagenzien mit ca. 800 - 900 ml Aqua bidest auffüllen, mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 einstellen und mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen
58,4 g	NaCl	

**Tris-HCl-Puffer (1 x)**

Menge	Reagenz	Anleitung
100 ml	10 x Tris-HCl-Puffer (pH 7,4)	mit 900 ml Aqua dest vermischen
250 µl	Triton-X-100	in Tris-HCl-Puffer lösen

**Tris-HCl-Puffer (0,1 M)**

Menge	Reagenz	Anleitung
1,2 g	Tris-HCl	beide Reagenzien miteinander vermischen und mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 7,3 einstellen
100 ml	DEPC-Wasser	

### Waschpuffer (IB)

Menge	Reagenz	Anleitung
2,0 g	BSA	BSA in PBS-Puffer auflösen und Tween-20 hinzufügen
200 ml	0,1 M PBS-Puffer (pH 7,4)	
200 µl	Tween-20	

### Wasserstoffperoxidlösung (3,0%ig)

Menge	Reagenz	Anleitung
45 ml	Methanol	beide Reagenzien miteinander vermischen
5 ml	30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	

## 9.2 Bezugsquellen

### 9.2.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
ABC-Elite Kit Standard; Vector Vectastain	Vector Laboratories, Burlingame, England
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
AEC	Biologo, Kronshagen, Deutschland
Agarose	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Ampicillin (2,5 mg)	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Anti-DIG-Fab-Antikörper	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
APAAP-Maus-Enzymkomplex	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
APES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Blockingpeptid 60-C-Antikörper	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland

Reagenz	Hersteller
Blockingpeptid F-10-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Blockingpeptid HC-20-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau-Stammlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dextransulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DNA-Größenstandard (100bp DNA-ladder)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DNA-Ligase (T4)	Promega, Mannheim, Deutschland
DNA-Purifikationssystem QIAEX II	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNase I, RNase-frei	Roche über Invitrogen Ltd., Paisley, UK
dNTP Mix (2 mM)	Applied Biosystems,, Foster City, CA, USA
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
EDTA-Lösung (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin (Instant Eosin Aqueous)	Shandon, Frankfurt, Deutschland
Ethanol, vergällt	Schmitt, Dillenburg, Deutschland
Ethanol, rein	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ficoll 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fuchsin	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Glyceringelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Reagenz	Hersteller
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glyzin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Go Taq Buffer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Hämatoxylin (Instant Hematoxylin)	Shandon, Frankfurt, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Q Biogene, USA
LB-Agar-Medium	Q Biogene, USA
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ligase-Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
Lithium-Chlorid-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid für PCR	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NBT-BCIP-Entwicklerlösung	KPL, Gaithersburg, USA
Paraffin	Vogel, Gießen, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PCR-Puffer Gold	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA



Reagenz	Hersteller
Pikrinsäurelösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
pGEM-T Vektor	Promega, Mannheim, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon (2%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Primärantikörper ER $\alpha$ (60C)	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland
Primärantikörper ER $\alpha$ (1D5)	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Primärantikörper ER $\alpha$ (1F3)	Abcam plc, Cambridge, England
Primärantikörper ER $\alpha$ (F-10)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Primärantikörper ER $\alpha$ (H-184)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Primärantikörper ER $\alpha$ (HC-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Primärantikörper Ki-67	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random Hexamers	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Restriktionsenzyme (Not I, Nco I)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Reverse Transkriptase MultiScribe®, 5 U/l	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNA-Polymerasen (T7 und Sp6)	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase A/RNase T1-Stammlösung	Boehringer, Mannheim, Deutschland
RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNeasy FFPE Kit (Cat.No. 74404)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Micro Kit (Cat.No. 74004)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Plus Mini Kit (Cat.No. 74134)	Qiagen, Hilden, Deutschland

Reagenz	Hersteller
Salmon-Sperm-DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Sekundärantikörper Kaninchen-anti-Maus	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Sekundärantikörper Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, Schaf-anti-Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen, biotiniliert	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen	KPL Inc., Gaithersburg, Maryland, USA
Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus, biotiniliert	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
SuperSignal West Femto Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Sybr®Green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tetrazyclin (1,5 mg)	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Tissue Tek® O.C.T.TM Compound 4584	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Trichlormethan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIzol®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween®20 P1379	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Vitro-Clud®	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol-Stammlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Reagenz	Hersteller
Yeast-t-RNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ziegenserum	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### 9.2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Agagel Mini Elektrophoresekommer	Biometra, Göttingen, Deutschland
AutoDELFIA automatic immunoassay system	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, Deutschland
Autoklav	MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
Axiophot	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Bio Photometer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Einbettgerät Leica EG 1160	Leica, Solms, Deutschland
Entwässerungsgerät Leica TP 1050	Leica, Solms, Deutschland
Feuchte Kammer	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande
Gefriermikrotom Kryostat 2800 Frigocut-E	Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland
Heizplatte Heidolph MR3003	MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
inoLab pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM LB	Leica, Solms, Deutschland
Palm® MicroBeam System	Palm Microlaser Technologies, Bernried, Deutschland
Schlittenmikrotom Leica SM 2000 R	Leica, Solms, Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Heraeus über MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
Sterilisator Heraeus	MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
Stromgeber POWER PAC 200	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Geräte	Hersteller
T3-Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Transilluminator UVsolo	Biometra, Göttingen, Deutschland
Trockenschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Ultra-Turrax-Gerät T8	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortexer REAX control	MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad Paraffinschnitte Typ 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge MIKRO 120	Hettich über MAGV GmbH, Rabenau- Londorf, Deutschland
Zentrifuge MIKRO 22R	Hettich über MAGV GmbH, Rabenau- Londorf, Deutschland

### 9.2.3 Sonstige Materialien

Sonstige Materialien	Hersteller
DAKO-Pen	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Escherichia coli, Eco XL-1 Blue	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
MembraneSlide 1.0 PEN Objektträger	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße Multi®-SafeSeal®- Tubes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikrozentrifugenröhrchen (LPC-Tubes)	Palm Microlaser Technologies, Bernried, Deutschland
Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich 0,45µm Pore Size LC 2001	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger SuperFrost	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
UVette® (Einmalküvetten)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

**9.2.4 Software**

Software	Hersteller
CFX96 <sup>TM</sup> Manager Software Version 1.6	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Palm <sup>®</sup> Robo Software	Palm Microlaser Technologies, Bernried, Deutschland
SPSS Version 12.0	SPSS, Chicago, IL, USA

### 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Mitarbeit und ihre Unterstützung zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Bergmann, für die Überlassung des Themas, für sein immer offenes Ohr und zum Mikroskopieren bereites Auge, seine gute konstruktive Kritik und seine fachlichen Ratschläge für Veröffentlichungen und neue Versuche, seine Unterstützung beim Anfertigen der Dissertation, sowie seinen unschlagbaren Optimismus.

Bei Frau Dr. S. Lauf (Institut für Zellbiologie, München) bedanke ich mich ganz herzlich für die Durchführung der Nested-PCR.

Bei Frau Dr. O. Raabe (Institut für Veterinär-Anatomie, Gießen) bedanke ich mich sehr für die Durchführung der ISH.

Frau S. Fröhlich (Institut für Anatomie, Gießen) danke ich für die Durchführung des Immunoblots.

Für die Bereitstellung des Probenmaterials möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. S. Kliesch (Centrum für Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Münster) bedanken.

Herrn PD Dr. L. Fink (Institut für Pathologie, JLU Giessen) danke ich für die Gelegenheit, das Palm® MicroBeam System nutzen zu dürfen.

Bei Frau J. Dern-Wieloch, A. Hax, A. Hild, S. Schubert-Porth, R. Weigel und Herrn J. Vogelsberg bedanke ich mich sehr für die Einführung in die Untersuchungstechniken im Labor, sowie die Hilfestellungen und die Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche.

Ich bedanke mich zudem ganz herzlich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Anatomie, insbesondere bei Britta, Dani, Karola, Sabine, Sarah und Tini. Danke für euren fachlichen und technischen Beistand, den ich vor

allen Dingen in der Anfangszeit sehr gut gebrauchen konnte und ohne den so mancher Versuch vielleicht nicht so gut funktioniert oder der PC das ein oder andere Mal mehr den Geist aufgegeben hätte. Dani, dir noch einmal ein ganz besonderer Dank für deine unermüdliche Unterstützung und Hilfe bei so vielen Dingen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinem Mann Roland für ihr Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung während meiner Promotion.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6175-3



9 78 3 835 9617 53

Photo cover: © Brad Pict - Fotolia.com